

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Genetische und molekularbiologische Analyse der
Interaktion der Src-Kinase Hck mit dem
niedermolekularen Inhibitor PP1**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Ruth Mathes
aus
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hallek

Mitberichterstatter: PD Dr. P. Kahle
PD Dr. C. Klein

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

Für meine Mutter Finni

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit bestätige ich, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe und mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft und Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

München, den 12.07.2005

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das folgende Patent angemeldet:

Warmuth M., **Mathes R.** und Hallek M. (2001): Verfahren zum Selektieren von Inhibitoren für Enzyme; Patentschrift DE 100 24 174 A1

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Src-Kinasen.....	1
1.1.1	Die Familie der Src-Kinasen	1
1.1.2	Die molekulare Struktur und Regulation von Src-Kinasen.....	2
1.1.3	Die Rolle der Src-Kinasen in der Hämatopoese und der Pathogenese der CML	4
1.2	Die Inhibition von Src-Kinasen.....	7
1.2.1	Die Src-Kinasen-Inhibitoren	7
1.2.2	Die Src-Kinase Hck im Komplex mit PP1.....	7
1.2.3	Systematische Mutation von Hck zur Untersuchung der Bindungsspezifität von PP1.....	8
1.3	Die chronisch myeloische Leukämie (CML)	11
1.3.1	Definition der CML	11
1.3.2	Epidemiologie der CML.....	11
1.3.3	Ätiologie der CML	12
1.3.4	Krankheitsverlauf und Prognose der CML	12
1.3.5	Therapieoptionen der CML.....	13
1.4	Die Pathogenese der CML	16
1.4.1	Das Bcr-Gen.....	16
1.4.2	Das c-Abl-Gen	17
1.4.3	Die Philadelphia-Translokation	17
1.4.4	Das p210 ^{Bcr-Abl} -Fusionsprotein.....	19
1.5	Ziele der Arbeit.....	22
2.	Material und Methoden.....	23
2.1	Material	23
2.1.1	Zelllinie.....	23
2.1.2	Bakterienstämme	23
2.1.3	Allgemeines Labormaterial	23
2.1.4	Material für DNA-Arbeit	25
2.1.5	Material für Zellkultur, Transfektion und Zellyse.....	29
2.1.6	Material für Proteinarbeit.....	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Amplifikation der DNA.....	31
2.2.2	Arbeiten mit Bakterien	32

2.2.3	Präparation und Analyse von DNA.....	33
2.2.4	Zellkultur der Cos7-Zellen.....	35
2.2.5	Transfektion der Zellen und Inkubation mit PP1	35
2.2.6	Lyse der Zellen	36
2.2.7	Westernblot	37
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	PP1 inhibiert den Hck Wildtyp mit einer Konzentration von 50µmol/l.....	40
3.2	Untersuchung der Hck Taschen-Mutanten auf Kinase-Aktivität und Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1	41
3.2.1	Die Mutation zu Phenylalanin an den Positionen L325 oder I336 zeigt Hck wt Kinase-Aktivität.....	41
3.2.2	Bei keiner der Taschen-Mutanten ist eine Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1 nachweisbar	42
3.3	Untersuchung der Hck Eingangs-Mutanten auf Kinase-Aktivität und Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1	44
3.3.1	Die Mutationen an den Positionen T338 und A403 weisen Kinase-Aktivität auf	44
3.3.2	Die Eingangs-Mutanten der Position A403 sind sensitiv gegenüber PP1	45
3.3.3	Die Mutation der Position T338 zu Leucin, Methionin, Glutamin oder Phenylalanin zeigt Resistenz gegenüber PP1	46
4.	Diskussion	48
4.1	Untersuchung des Bindemechanismus des Kinase-Inhibitors PP1 mit der Src-Kinase Hck	48
4.2	Bedeutung Inhibitor-resistenter Mutanten für die Selektion und Spezifizierung von Kinase-Inhibitoren.....	51
4.3	Anwendung des Systems zur funktionellen Untersuchung von Src-Kinasen	52
4.4	Klinische Anwendung von Kinase-Inhibitoren	53
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Literaturverzeichnis.....	56
7.	Anhang	72
8.	Lebenslauf.....	74

1. Einleitung

1.1 Die Src-Kinasen

1.1.1 Die Familie der Src-Kinasen

Die Familie der Src-Kinasen gehört zu den am intensivsten untersuchten Kinasen mit onkogener Wirkung. Es handelt sich dabei um membran-assoziierte, zytoplasmatische Protein-Tyrosinkinasen. Sie umfasst neun Mitglieder (Src, Blk, Yes, Yrk, Fgr, Fyn, Lyn, Lck und Hck), von denen zum Teil durch alternatives Splicing verschiedene Isoformen exprimiert werden (Brown and Cooper, 1996). Die Entdeckung der namensgebenden Kinase Src geht auf die Identifizierung des Rous-Sarkom-Virus als Auslöser von Sarkomen bei Hühnern zurück. Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Virus-DNA für ein Protein kodiert, das Tyrosinkinase-Aktivität besitzt. Es wurde als v-Src bezeichnet und gilt seither als das transformierende Onkogen des Virus (Jove and Hanafusa, 1987).

Es konnten seitdem weitere Mitglieder der Src-Familie identifiziert werden, wobei sich deren Zugehörigkeit durch eine Homologieregion innerhalb der katalytischen Domäne sowie die gleichförmige Regulation der Kinase-Aktivität definiert (Brown and Cooper, 1996).

Die Src-Kinasen werden alle nach einem spezifischen Muster in bestimmten Geweben exprimiert. So sind die Kinasen Blk, Hck, Fgr und Lck vor allem in hämatopoetischen Zellen zu finden. Dagegen werden c-Src und Fyn in vielen verschiedenen Geweben exprimiert (Bolen et al., 1992; Taguchi et al., 2000).

Src-Kinasen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation vieler Signaltransduktionswege in B- und T-Zellen des Immunsystems (Perlmutter, 1995). So lässt sich annehmen, dass die Hyperaktivität einzelner Src-Kinasen in verschiedenen Tumortypen an der Entstehung von Krebs und Leukämie beteiligt ist. Viele biologische Funktionen von Src-Kinasen hängen mit ihrer Fähigkeit zusammen, über die SH3- und SH2-Domäne (Src homology domain) mit Bindungspartnern zu interagieren.

1.1.2 Die molekulare Struktur und Regulation von Src-Kinasen

Src-Kinasen lassen sich in sechs funktionelle Abschnitte untergliedern (Abb. 1.1.1). Die N-terminale Myristoylierungsstelle ist verantwortlich für die Lokalisation der Src-Kinase an der Zellmembran. Die Fettsäure Myristat wird hierbei über eine Amidbindung an ein konserviertes Glycin gebunden (David-Pfeuty et al., 1993; Resh, 1996). Die Bedeutung dieser Struktur für die biologische Funktion der Src-Kinasen wurde in mehreren Arbeiten belegt, allerdings scheint sie alleine nicht für eine stabile Assoziation der Src-Kinasen an die Zellmembran auszureichen. Für eine feste Verankerung sind wenigstens zwei weitere Regionen nötig (Bagrodia et al., 1993; Cross et al., 1984).

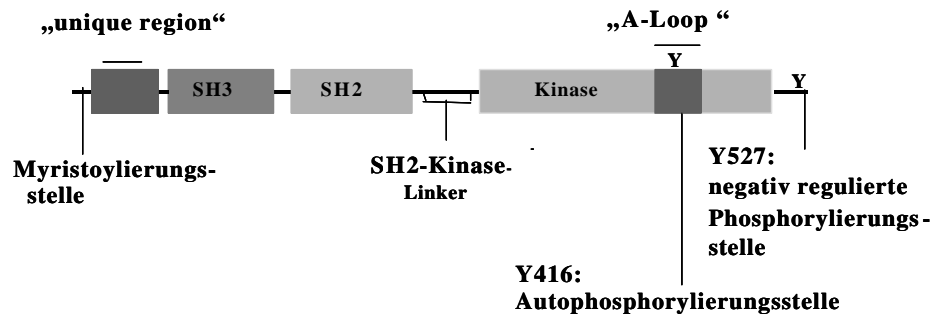
An die Myristoylierungsstelle schliesst sich eine Region an, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenz innerhalb der Src-Kinasen Familie als „unique region“ bezeichnet wird. Man nimmt an, dass diese Domäne die Spezifität der Kinasen bestimmt.

Die darauf folgende SH3-Domäne fungiert als Erkennungsregion für prolinreiche Aminosäuresequenzen (P-X-X-P). Sie spielt eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der enzymatischen Aktivität von Src-Kinasen. Auch wird vermutet, dass die SH3-Domäne die subzelluläre Lokalisation von Signalproteinen beeinflusst (Bar-Sagi et al., 1993). In fast allen zytoplasmatischen Tyrosinkinasen findet man eine SH2-Domäne, die als Erkennungssequenz für Phosphotyrosine dient (Pawson, 1995). Darüber hinaus spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Aktivität der Src-Kinasen. Auf die SH2-Domäne folgt schliesslich die SH1- bzw. Kinasedomäne. Diese hat die höchste Sequenzhomologie innerhalb der Src-Kinasen Familie. Sie besteht aus zwei Subdomänen, dem N-Lobe und dem C-Lobe, sowie dem dazwischen liegenden katalytischen Zentrum. Den Abschluss bildet eine am C-Terminus gelegene Region, die wichtig für die Regulation der Kinase-Aktivität ist. Die Aktivität von Src-Kinasen wird durch ein Netzwerk intramolekularer Interaktionen reguliert. Erste Hinweise auf die Regulierbarkeit von Src-Kinasen gab die Aktivierung von Src-Kinasen durch Phosphatasen in Zellysaten. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität und damit auch die biologische Aktivität der Src-Kinasen vom Phosphorylierungszustand eines hochkonservierten, C-terminal gelegenen Tyrosinrests abhängt (Cartwright et al., 1987; Cooper and King, 1986). Die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrest Y527 bewirkte eine Reduktion der Aktivität der Src-Kinase (Brown und Cooper, 1996; Lowell und Soriano, 1996). Entsprechend führt die Dephosphorylierung dieses Rests zum Anstieg der Aktivität von Src-Kinasen (Hunter, 1997).

A

N-Terminus

C-Terminus



B

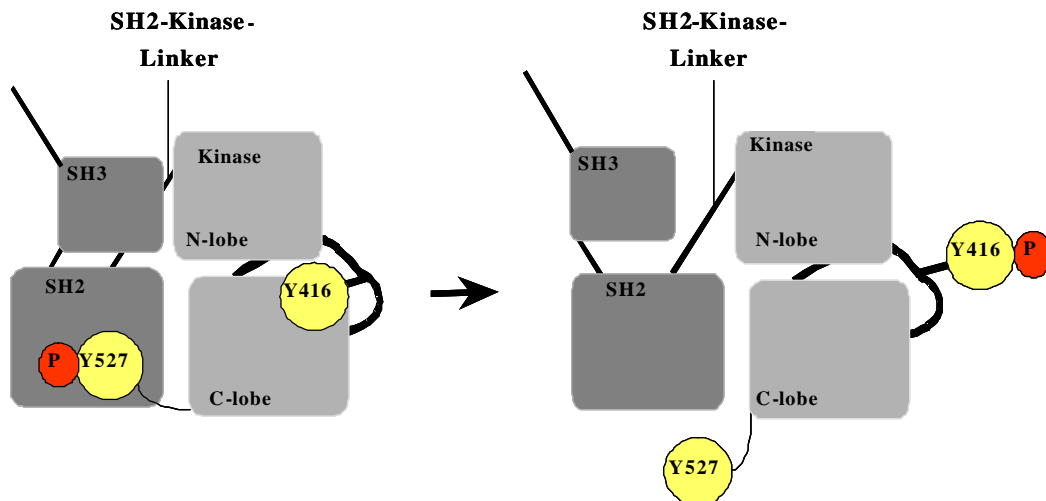


Abb. 1.1.1: Struktur und Regulation der Src-Kinasen. (A) Auf die N-terminale Myristoylierungsstelle folgt die „unique region“, die innerhalb der verschiedenen Mitglieder der Src-Kinasen-Familie nicht konserviert ist. Die SH2- und SH3-Domänen werden durch den SH2-Kinase-Linker von der katalytischen Domäne getrennt. Die Kinase-Domäne setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, dem N-Lobe und C-Lobe. Innerhalb des C-Lobes liegt die katalytische Schleife (A-Loop), die das autoregulative Tyrosin an Position 416 beinhaltet. Am C-Terminus befindet sich an der Position 527 ein negativ-regulatorischer Tyrosin-Rest. Die ATP-Bindungsstelle ist am N-Lobe lokalisiert, am C-Lobe befindet sich die Substrat-Bindungsstellen. (B) Die Regulation der Kinase-Aktivität findet über intramolekulare Bindungsmechanismen statt, wobei die SH3-Domäne an eine Polyprolin-Helix im SH2-Kinase-Linker bindet. Die negativ-regulierende Funktion der SH2-Domäne wird über den phosphorylierten Tyrosinrest Y527 im C-Terminus vermittelt. Bei der Aktivierung der Kinase wird hingegen der Tyrosinrest Y416, der sich im Aktivierungssegment befindet, phosphoryliert.

Allerdings ist die Regulation der Src-Kinasen nicht alleine durch die Phosphorylierung am C-Terminus zu erklären. Als weiterer Regulationsmechanismus trägt die Interaktion der SH3-Domäne mit dem SH2-Kinasen-Linker bei. Innerhalb dieses Linkers liegt eine Polyprolin-Helix, die intramolekular an die SH3-Domäne bindet. Im inaktiven Zustand ist die Kinase so gefaltet, dass sowohl der Tyrosinrest Y416, als auch die ATP-Bindungsstelle unzugänglich sind (LaFevre-Bernt et al., 1998). Hierzu trägt auch die Konformation der katalytischen Schleife (A-Loop) bei (Xu et al., 1997; Sicheri et al., 1997). Die Faltung wird durch die Interaktion der SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosinrest Y527 im C-Terminus der Kinase stabilisiert. Mittlerweile konnten einige Tyrosinkinase, die diesen Tyrosinrest phosphorylieren, identifiziert werden. Dazu zählen zum Beispiel CSK (C-terminal Src-Kinase) oder CHK (CSK homologous kinase) (Okada et al., 1991). Die Aktivität dieser Kinasen ist somit kritisch für die negative Regulierung der Src-Kinasen (Bennett et al., 1994; Nada et al., 1991). Die Veränderung solcher regulatorischer intramolekularer Interaktionen durch gezielte Mutagenese führt zu einer Deregulation der Kinase-Aktivität, sowie zu einem zunehmenden Transformationsvermögen der Src-Kinasen (Briggs and Smithgall, 1999; Cartwright et al., 1987; Gonfloni et al., 1997). Des Weiteren wird die Enzymaktivität der Kinasen durch die Phosphorylierung des innerhalb der Kinasedomäne liegenden Tyrosinrests Y416 reguliert.

1.1.3 Die Rolle der Src-Kinasen in der Hämatopoese und der Pathogenese der CML

Die ersten Hinweise auf das onkogene Potential der Src-Kinasen gab die Beobachtung, dass v-Src ein Interleukin-3 (IL-3) unabhängiges Wachstum in einer Vielzahl von hämatopoetischen Zelllinien induziert (Anderson et al., 1990). Darüber hinaus inhibiert v-Src die durch G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) stimulierte granulozytäre Differenzierung der IL-3 abhängigen myeloischen Mauszelllinie 32D (Kruger and Anderson, 1991).

Src-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in den Signalkaskaden hämatopoetischer Wachstumsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen bei der Signaltransduktion zahlreicher Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Dies wurde für eine Reihe von Interleukinen wie zum Beispiel dem IL-6 beschrieben (Corey et al., 1999; Hallek et al., 1997). Des weiteren

reagieren Src-Kinasen unter anderen mit den Rezeptoren für IL-2, IL-5, IL-6 oder Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie dem PDGFR (platelet derived growth factor receptor) oder EGFR (epidermal growth factor receptor) (Adachi et al., 1999; Hatakeyama et al., 1991; Kypta et al., 1990; Muthurwamy and Muller, 1995; Ward et al., 1996). Adapterproteine wie c-Cbl oder Tyrosinkinasen wie FAK (focal adhesion kinases) oder Bcr-Abl stellen weitere Bindungspartner dar (Schlaepfer et al., 1994; Warmuth et al., 1997).

Die wichtige Rolle von Src-Kinasen in der Signaltransduktion hämatopoetischer Faktoren wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass Mäuse mit defekten Src-Genen eine Reihe pathologischer Veränderungen in der Hämatopoese zeigen. So ist in Lck- oder Lyn-defizienten Mäusen beispielsweise die Reifung und das Wachstum von T- und B-Zellen gestört (Chan et al., 1997; Lowell and Soriano, 1996). Src^{-/-} Hck^{-/-} Doppel-Knockout-Mäuse weisen eine erhöhte extrameduläre Hämatopoese auf (Lowell et al., 1996).

Die stichhaltigsten Daten für eine Beteiligung der Src-Kinasen-Familie bei der Entstehung von hämatologischen Neoplasien, gibt es für die Philadelphia-Chromosom (Bcr-Abl)-positiven Leukämien, wozu auch die chronisch myeloische Leukämie (CML) zählt. Untersuchungen an 32D-Zellen haben ergeben, dass Bcr-Abl zur Aktivierung der Src-Kinasen Lyn und Hck führt. Dieser Aktivierung liegt wahrscheinlich eine direkte Assoziation zwischen Src-Kinasen und Bcr-Abl zugrunde (Danhauser-Riedl et al., 1996). Der Bindungs- und Aktivierungsmodus zwischen Bcr-Abl und Src-Kinasen ist sehr komplex und bis heute nicht ganz geklärt. Es wurde gezeigt, dass sowohl die SH3- und SH2-Domäne von Hck als auch die des Bcr-Abl-Proteins sowie dessen C-Terminus als potentielle Interaktionspartner agieren (siehe Kapitel 1.4.4) (Lionberger, 2000; Stanglmaier, 2003).

Studien mit Fibroblasten zeigen, dass Src-Kinasen in vielen weiteren zellulären Prozessen eine Rolle spielen, inklusive Mitose, Proliferation, Überleben, Kontrolle der Zelladhäsion und Migration. Gerade diese Faktoren sind während der Kanzerogenese dereguliert. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung von STAT (signal transducer and activator of transcription) Proteinen durch v-Src ein kritischer Schritt in der Transformation von Fibroblasten oder hämatopoetischen Zellen darstellt (Bromberg et al., 1998; Cao et al., 1996). Neuere Studien erbrachten Hinweise, dass dieser Signalweg auch in der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt. Niu und Kollegen konnten zeigen, dass c-Src und STAT3 konstitutiv in einer menschlichen Melanomzelllinie und auch in Melanomgewebe aktiviert sind (Niu et al., 2002).

Es gibt des weiteren Hinweise, dass Src-Kinasen auch an der Aktivierung des Ras-Signalwegs beteiligt sind. Ras ist ein Guanosintriphosphat (GTP) bindendes Protein, das in der Regulation des Zellwachstums und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt und auch in der Pathogenese der CML von Bedeutung ist. Dabei scheint Ras sowohl anti-apoptotische als auch proliferative Signale zu vermitteln (Amrein et al., 1992).

Ein weiterer Signalweg, in den die aktivierten Src-Kinasen eingreifen, ist der Akt-Signalweg. Die Akt Serin/Threonin-Kinase übernimmt in der Entwicklung von Krebs eine Kontrollfunktion, die sowohl das Überleben als auch die Differenzierung von Zellen steuert (Datta et al., 1999). Einige der Substrate von Akt, wie zum Beispiel p21, Caspase 9 oder Bad sind Regulatoren der Apoptose (Nicholson et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Src-Kinasen direkt oder über die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen eine bedeutende und zum grossen Teil noch nicht verstandene Rolle in der Kanzerogenese spielen.

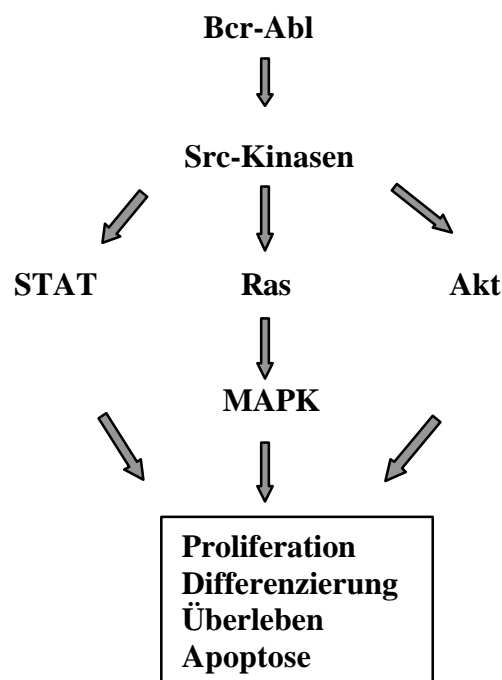


Abb. 1.1.2: Die durch das Bcr-Abl Protein ausgelöste Signaltransduktion. Die konstitutive Aktivierung der Src-Kinasen führt zu einer Reihe von Aktivierungen verschiedener zytoplasmatischer und nukleären Signaltransduktionswege, die das Wachstum und das Überleben hämatopoetischer Zellen beeinflussen. So wird über den STAT-Signalweg die Zellproliferation induziert, Akt vermittelt proliferative und anti-apoptotische Signale, Ras spielt eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung.

1.2 Die Inhibition von Src-Kinasen

1.2.1 Die Src-Kinasen-Inhibitoren

Src-Kinasen sind attraktive Zielmoleküle für eine molekulare Therapie von zahlreichen Tumorerkrankungen und hämatopoetischen Neoplasien wie zum Beispiel der CML (Levitzki, 1996; Bolen und Brugge, 1997). Viele Inhibitoren von Proteinkinasen binden an der ATP-Bindungsstelle im katalytischen Zentrum und sind aufgrund der hohen strukturellen und funktionellen Homologie dieser Region oft relativ unspezifisch. Es wurden verschiedene mehr oder weniger selektive Inhibitoren für Src-Kinasen beschrieben, unter anderen PP1, ein Pyrazolo-Pyrimidin Derivat (Levitzki, 1996; Showalter and Kraker, 1997). Hanke und Kollegen zeigten 1996, dass PP1 Lck und Fyn *in vitro* bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen inhibiert, als die nicht zur Src-Kinasen-Familie gehörenden Kinasen JAK2, ZAP-70 und Proteinkinase A (Hanke et al., 1996). PP1 ist auch innerhalb von Zellen aktiv, was durch die Inhibierung der Phosphorylierung ganzer Zellen sowie der Inhibierung der CD3 aktivierten Proliferation von T-Zellen, gezeigt wurde (Bishop et al., 1997).

1.2.2 Die Src-Kinase Hck im Komplex mit PP1

Liu und Kollegen zeigten, dass die Aminosäure an der Position 338 in Src eine Schlüsselposition für die Inhibierung durch PP1 einnimmt. So kann c-Src, das an 338 ein Threonin besitzt, durch PP1 inhibiert werden, v-Src, das dort ein Isoleucin verfügt, hingegen nicht (Liu et al. 1999).

Kurz darauf wurde von Schindler und Kollegen die Kristallstruktur von Hck im Komplex mit PP1 aufgeklärt (Schindler et al., 1999). In dieser Arbeit wurden die Aminosäurenreste der katalytischen Domäne, Position 385 – 403, identifiziert, die für die Bindung von ATP verantwortlich sind. Auf die katalytische Domäne folgt das Aktivierungssegment, Position 404 – 432, das in den meisten Proteinkinasen die Phosphorylierung kontrolliert (Johnson et al., 1996). Y416, das für die Regulation der Autophosphorylierung zuständig ist, liegt innerhalb dieses Aktivierungssegmentes. PP1 ist an die ATP-Bindungsstelle innerhalb der Kinase gebunden, wobei eine Methylphenyl-Gruppe in eine angrenzende hydrophobe Tasche reicht. Diese liegt im Kern der Kinase-Domäne, eingebettet zwischen den beiden

Subdomänen, den N-Lobe und dem C-Lobe. Der Eingang dieser Tasche wird durch die Seitenketten von T338 und A403 begrenzt. Die Tasche selber wird von mehreren Aminosäuren umschlossen, worunter M314, V323, L325 und I336 Schlüsselpositionen einnehmen.

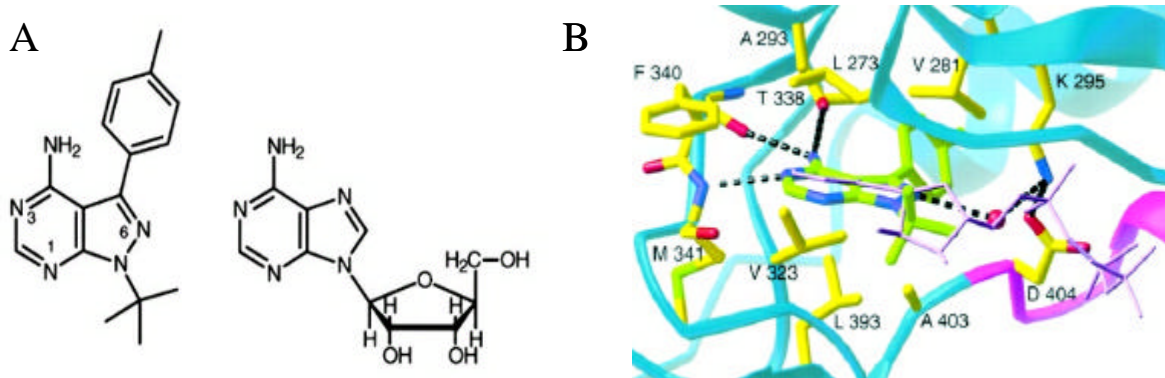


Abb. 1.2.1: Die Bindung von PP1 an Hck. (A) Vergleich der Strukturformeln von PP1 (links) und Adenosin (rechts). (B) Die Struktur von PP1 gebunden an Hck. Das Polypeptidrückrad des Aktivierungsegments ist in Magenta dargestellt. PP1 und selektive Seitenketten von Hck sind im Stabmodell, Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt (Abb. Schindler et al., 1999).

1.2.3 Systematische Mutation von Hck zur Untersuchung der Bindungsspezifität von PP1

Inhibitoren wie PP1 können dazu benutzt werden, Signalwege zu untersuchen, da sie mit relativ hoher Selektivität Kinasen zu blockieren. Allerdings sind bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht alle humanen Proteinkinasen identifiziert. So besteht bei der Untersuchung von Kinase-Inhibitoren immer die Problematik, dass der Inhibitor auch andere Kinasen inhibieren kann. Durch die systematische Mutation von Aminosäurepositionen, die entscheidend für die Bindung des Inhibitors sind, kann die Zielstruktur-Spezifität genauer verstanden werden.

Wie schon in Kapitel 1.2.2 erwähnt, bindet PP1 an die ATP-Bindestelle der Kinase-Domäne und blockiert somit die Bindung von ATP. Mutationen von Hck an den „Schlüssel-Aminosäuren“ der ATP-Bindungsstelle sollten zu einer kompletten Resistenz gegenüber PP1

führen, wobei dieselbe Kinase-Aktivität wie die des Hck wt (Wildtyp) vorausgesetzt werden muss.

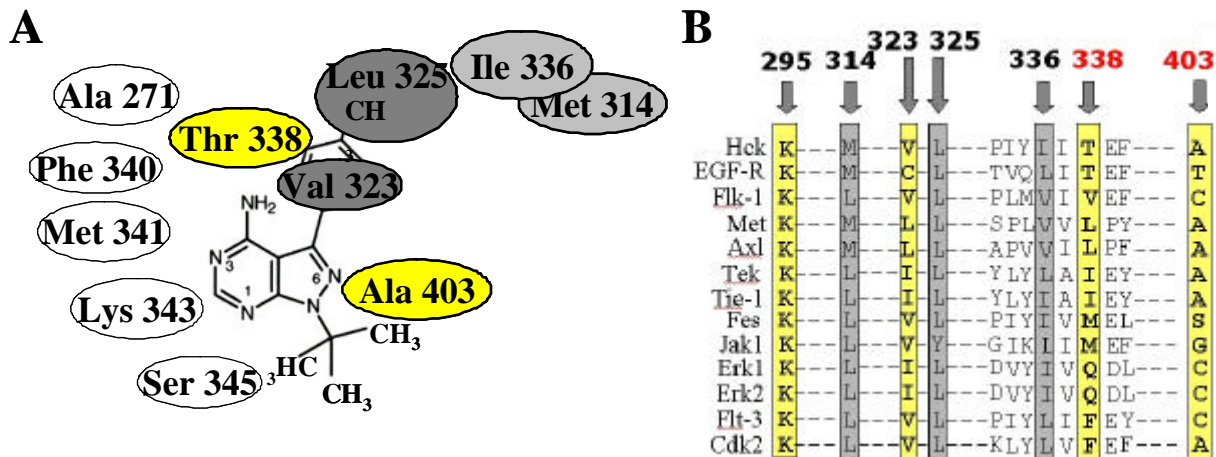


Abb. 1.2.2: Grundlagen der Spezifität von PP1. (A) Die den Tascheneingang bildenden Aminosäuren sind gelb, die die hydrophobe Tasche bildenden Aminosäuren sind grau dargestellt. (B) Sequenzanalyse im Bereich der hydrophoben Tasche von verschiedenen Proteinkinasen. Die den Eingang begrenzenden Aminosäuren sind rot gekennzeichnet, die die Tasche begrenzenden grau.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch zwei verschiedene Prinzipien versucht, inhibitor-resistente Mutanten von Hck zu schaffen. Zum einen wurden die Aminosäuren an den Positionen T338 und A403, die den Eingang der hydrophoben Tasche begrenzen, gegen Aminosäuren mit längeren oder sperrigeren Seitenketten ausgetauscht. Zum anderen wurden gezielte Mutationen die hydrophobe Tasche selber betreffend, vorgenommen (Positionen M314, V323, L325, I336). Dabei wurden die ursprünglichen Aminosäuren entweder gegen die polare Aminosäure Threonin oder gegen Phenylalanin, das eine sehr sperrige Seitenkette besitzt, ausgetauscht. Die nach diesen beiden Prinzipien hergestellten Mutanten werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit jeweils als Eingangs- bzw. Taschen-Mutanten bezeichnet.

Die Aminosäuren, die zur Bildung des Taschenkerns beitragen, sind innerhalb der Proteinkinase-Familie hoch konserviert. Von einigen Aminosäurepositionen ist bekannt, dass sie wichtige katalytische Funktionen besitzen.

Im Gegensatz zur Tasche selbst, variiert der Tascheneingang beträchtlich von Kinase zu Kinase. Dies wird besonders an den Aminosäurepositionen 338 und 403 deutlich. An diesen Positionen befindet sich in Hck ein Threonin (T338) bzw. ein Alanin (A403). Vergleicht man verschiedene Proteinkinasen an den homologen Positionen, so wird deutlich, dass diese Positionen oft von längeren oder sperrigeren Aminosäuren besetzt werden. So findet man beispielsweise an Position 338 auch Leucin (L), Isoleucin (I), Methionin (M), Glutamin (Q) oder Phenylalanin (F) (Abb. 1.2.2 B).

1.3 Die chronisch myeloische Leukämie (CML)

1.3.1 Definition der CML

Eine Erkrankung, die mit der Aktivierung von Src-Kinasen im Zusammenhang steht, ist die chronisch myeloische Leukämie (CML). Es handelt sich dabei um eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Sie zählt neben der Polyzytämia vera, der essentiellen Thrombozytämie und der Osteomyelofibrose zu dem Formenkreis der chronischen myeloproliferativen Erkrankungen. Durch eine neoplastische Transformation einer pluripotenten Stammzelle beginnt im Knochenmark eine zunehmende Expansion dieses Klons. Die transformierten Zellen unterliegen nicht mehr einer regulierten Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Deininger, 2000). Daraus entsteht eine zelluläre Hyperplasie mit der Verdrängung normaler myeloider Zellen. Durch eine verminderte Adhäsion der Zellen im Knochenmark ist das erhöhte Vorkommen granulozytärer Vorstufen im peripheren Blut erklärbar (Deininger, 2000).

Auf chromosomaler Ebene ist die CML mit einer spezifischen Veränderung assoziiert. Es handelt sich um eine reziproke Translokation zwischen den c-abl-Protoonkogen des Chromosoms 9 und des bcr-Gens (breakpoint cluster region) auf dem Chromosom 22, wodurch das Philadelphia (Ph) Chromosom entsteht (Rowley, 1973). Diese Aberration ist bei 85% der Patienten mit einer CML zu finden, wobei mehr als 90% der malignen Zellen dieses Merkmal aufweisen. Es wurden über 300 verschiedene Varianten dieser Translokation beschrieben, wobei auch andere Chromosomen beteiligt sein können (Fitzgerald and Morris, 1991). Das Bcr-Abl Fusionsprotein aktiviert viele Signalwege innerhalb der Zelle, wobei auch die Src-Kinasen betroffen sind (s. 1.4.5).

1.3.2 Epidemiologie der CML

Mit einer Inzidenz von 15 auf 1 Million Einwohner pro Jahr macht die CML ungefähr 25% aller Leukämien aus. Sie ist eine Erkrankung des höheren Alters, mit einem Durchschnittsalter von 50 Jahren, wobei auch andere Altersgruppen inklusive Kinder betroffen sein können. 25% der Patienten sind 60 Jahre oder älter, was besonders auf die Therapiestrategien Auswirkungen hat (Mauro et al., 2001). Männer erkranken etwas häufiger

als Frauen, 85% der Erkrankungsfälle werden während der chronischen Phase im Rahmen einer Routineuntersuchung diagnostiziert (Epstein, 1999).

1.3.3 Ätiologie der CML

Durch epidemiologische Studien ist bekannt, dass die Exposition radioaktiver Strahlung einen Risikofaktor für die Entstehung der CML darstellt (Tanaka et al., 1989; Corso et al., 1995). Zudem konnte invitro gezeigt werden, dass durch ionisierende Strahlung die Fusion von Bcr-Abl in hämatopoetischen Zellen induziert werden kann (Deininger et al., 1998). Allerdings ist das Vorhandensein des Bcr-Abl-Gens in hämatologischen Zellen nicht alleine für die Ausbildung einer Leukämie verantwortlich. So findet man dieses Gen auch im Blut gesunder Menschen (Biernaux et al., 1996). Mittlerweile geht man von einer multifaktoriellen Genese aus.

1.3.4 Krankheitsverlauf und Prognose der CML

In der CML unterscheidet man drei verschiedene Phasen. Am Anfang steht die chronisch stabile Phase, die durchschnittlich 5-6 Jahre anhält (Kantarjian et al., 1988). Der Beginn der Erkrankung und die darauffolgenden Veränderungen des Blutbilds sind schleichend. Die ersten Beschwerden werden oft durch eine Splenomegalie hervorgerufen und zeigen sich als Druck- und Völlegefühl im linken Oberbauch, zum Teil verbunden mit in den Rücken ausstrahlenden Schmerzen. Hinzukommen können Müdigkeit, Abgeschlagenheit und B-Symptome wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß und subfebrile Temperaturen, die ohne Infekt auftreten. Im Verlauf der Erkrankung kann es durch die enorme Milzschwellung zu Milzinfarkten kommen. Im Blutbild ist ein Anstieg der Leukozyten auffällig. Meist sind es noch ausgereifte und funktionell nahezu normale Zellen. Ursache dieser massiven Vermehrung ist eine Transformation einer pluripotenten Stammzelle mit expansivem Wachstum. In dem Knochenmarkpunktat ist dies durch eine zunehmende Vermehrung der Granulopoese sowie einer Verminderung der Erythropoese und Thrombopoese zu beobachten. Während der chronischen Phase sind die Zellen des malignen Klon wenig invasiv und verbleiben oft in hämatopoetischen Geweben wie Knochenmark, Milz und Leber.

Später, in der Blastenkrise können myeloische Wucherungen in sämtlichen Organen gefunden werden.

Die Akzelerationsphase entspricht einer Übergangsphase in die Blastenkrise, die im Durchschnitt 6-9 Monate andauert (Schiffer et al., 2003). Sie zeigt sich durch eine zunehmende Leukozytose im peripheren Blut mit bis zu 500 000 Leukozyten/ μ l. Im Differentialblutbild findet man neben reifen Granulozyten eine Linksverschiebung mit Auftreten von Vorstufen der Granulopoese bis zum Myeloblasten. Dazu treten oftmals eine normozytäre normochrome Anämie, sowie eine Thrombozytopenie auf.

Über 80% der Erkrankten mit einer CML gehen in eine akute Phase über, die einer akuten Leukämie gleichkommt und im Durchschnitt mit dem Tod in 3-6 Monaten endet (Schiffer et al., 2003). Man spricht auch von einer Blastenkrise, da durch einen rapiden Anstieg die Myeloblasten und Promyelozyten mehr als 30% aller kernhaltigen Zellen im peripheren Blut ausmachen. Hinzu kommen Fieber, ausgeprägte B-Symptomatik und durch die Thrombozytopenie ausgelöste Blutungen. Circa 20 bis 25% der Patienten kommen in die Blastenkrise, ohne zuvor eine akzelerierte Phase durchlaufen zu haben. Die konsequente Trennung dieser Phasen erscheint klinisch nicht immer korrekt und sinnvoll durchführbar.

Die Prognose der CML hat sich durch neue Therapieverfahren deutlich gebessert. Die mittlere Überlebenszeit hat sich seit 1980 auf 5 - 7 Jahre verdoppelt, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 50% (Faderl et al., 1999). Verschiedene Faktoren wie das Alter des Patienten, der Grad der Splenomegalie sowie die Anzahl der Thrombozyten oder Blasten im peripheren Blut fließen in den Sokal-Index ein, der eine Einteilung und eine Prognose des individuellen Patienten ermöglicht (Sokal et al., 1988).

1.3.5 Therapieoptionen der CML

Die Wahl der Therapie der CML muss sowohl das Alter des Patienten, die Phase der Erkrankung als auch deren Dauer berücksichtigen. Als Chemotherapeutika stehen alkylierende oder antimetabolische Substanzen wie Busulfan und Hydroxyurea zur Verfügung. Allerdings gelten diese konventionellen Chemotherapien als rein palliativ und werden zur symptomatischen Behandlung der durch die myeloide Hyperplasie und Splenomegalie hervorgerufenen Beschwerden eingesetzt.

Seit 1983 stehen verschiedene Interferone (INF) zur Verfügung, wobei die meisten Daten für das Interferon- α erhoben wurden. Die Interferone sind eine komplexe Gruppe von natürlich vorkommenden Zytokinen, die von eukaryontischen Zellen in Antwort auf Antigen-Antikörper-Kontakt ausgeschüttet werden. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Überlebenszeit von CML-Patienten, die mit INF- α behandelt wurden, signifikant länger ist, als die, die mit Busulfan oder Hydroxyurea behandelt wurden (Kantarjian et al., 1995; Allan et al., 1995). Bis vor kurzem war die INF- α -Therapie Mittel der Wahl bei Patienten, die nicht für eine Knochenmarkstransplantation (KMT) in Frage kamen (Faderl et al., 1999). Dieses Medikament besitzt, besonders bei älteren Patienten, ein breites Spektrum an Nebenwirkungen. Allerdings ruft es in 10 – 30 % der Patienten eine zytogenetische Antwort hervor (Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group, 1997). Eine französische Multicenter-Studie konnte zeigen, dass die Kombination mit Ara-C (Araninosyl Cytosine), ein Antimetabolit, zu einem Anstieg der Überlebensrate im Gegensatz zur alleinigen Verabreichung von INF- α führt (Guilhot et al., 1997). Dies konnte allerdings durch eine neuere Studie nicht bestätigt werden (Baccarani, 2002).

Ein grundlegend neuer Therapieansatz wurde mit der Einführung des Abl spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib mesylate (Gleevec, STI-571) gefunden. Imatinib wurde 1998 erstmals bei Patienten eingesetzt, deren Erkrankung unter der INF- α -Therapie refraktär war oder die INF- α nicht tolerierten (Savage, 2002). Imatinib induziert eine komplette hämatologische Remission in mehr als 95% der Patienten, die resistent gegenüber INF- α sind, sich jedoch noch in der chronischen Phase befinden. Eine zytogenetische Antwort kann in 40–50% induziert werden (Druker, 2001). Die International Randomised Study of Interferon versus STI-571 Studie erbrachte, dass die Rate der hämatologischen und cytologischen Antwort unter Patienten mit einer neu diagnostizierten CML in der chronischen Phase mit Imatinib-Therapie wesentlich höher sind als die derjenigen, die mit INF- α kombiniert mit Ara-C behandelt wurden (Druker and The IRIS Study, 2002). So hatten 39% der Patienten innerhalb der Imatinib-Gruppe 12 Monate nach der Therapie eine Reduktion des Bcr-Abl-Levels von mindestens drei Log-Stufen. In der Gruppe der Patienten, die mit INF- α und Ara-C waren es hingegen nur 2% (Hughes, 2003). Zudem ist Imatinib gut verträglich und verursacht wenige Nebenwirkungen. Demgegenüber steht die rasche Entwicklung einer Resistenz bei einzelnen Patienten. Es wurden verschiedene Mechanismen der Resistenzentwicklung beschrieben. In vitro Studien mit resistenten Zelllinien zeigten eine

Amplifikation des Bcr-Abl-Gens, die mit einer Überexpression des Onkoproteins assoziiert ist (Mahon et al., 2000). Häufiger jedoch zeigen sich erworbene Punktmutationen innerhalb der Abl-Kinase-Domäne, die über eine veränderte Aminosäuresubstitution die Bindung von Imatinib in der Kinase-Tasche behindert (Branford, 2002; Hochhaus et al., 2002; Branford et al., 2003, Corbin, 2003).

Die einzige kurative Therapie der CML ist die allogene Knochenmarkstransplantation (KMT). Diese kann allerdings mit Komplikationen wie der graft-versus-host-disease (GVHD) und opportunistische Infektionen verbunden sein. Sie steht für 15 - 20% der Patienten zur Verfügung, da es oft keinen HLA-kompatiblen Spender gibt (Sawyers, 1999). Auch die Phase der Erkrankung und die Dauer spielen bei der Entscheidung zur KMT eine Rolle (Passweg, 2002). Des Weiteren wird die allogene KMT nur für Patienten bis zu einem Alter von 55 Jahren empfohlen, da die transplantsbedingte Mortalität im höheren Alter sehr ansteigt (Appelbaum, 2001; Goldman, 1997). Es wird allerdings versucht, durch die Reduktion der Intensität der anfänglichen Therapie mit zytotoxischen Substanzen oder radioaktiver Bestrahlung, die KMT auch für Patienten zu ermöglichen, die sonst nicht auf Grund ihres Alters geeignet wären. (Giralt et al., 2001; Or et al., 2003). Einige Patienten wurden dem entsprechend behandelt und zeigten sowohl zytogenetische als auch molekulare Remissionen (Uzunel, 2003). Langzeitergebnisse bleiben abzuwarten.

1.4 Die Pathogenese der CML

1.4.1 Das Bcr-Gen

Bcr wird in den meisten Zellen des Körpers exprimiert. Das Gen liegt auf dem Chromosom 22 und umfasst 23 Exons, die zusammen 134 kb DNA ausmachen. Bei den meisten Patienten mit einer CML und ungefähr bei einem Drittel der Patienten mit einer Ph-positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sind die Strangbrüche innerhalb der Exons 12-16 (ursprünglich b1-b5), die ein 5.8 kb langes DNA-Segment umfassen, lokalisiert (Deininger et al., 2000). Dieser DNA Abschnitt wird auch als „major breakpoint cluster region“ (M-bcr) bezeichnet. Weitere Strangbrüche werden auch in der „minor breakpoint cluster region“ (m-bcr), die das Exon 2 umfasst, beschrieben. Dadurch entsteht das kleinste der Fusionsgene, aus dessen mRNA sich ein 190 kD grosses Protein ableitet, das vorwiegend bei der ALL gefunden wird. So kann man diese Variante bei 80 % der Kinder und 50 % der Erwachsenen mit ALL nachweisen (Kurzrock et al., 1987).

Es wurde noch eine weitere, die Exons 20-23 umfassende, dritte „breakpoint of cluster region“ (μ -bcr) identifiziert. Dadurch entsteht ein 230 kD grosses Fusionsprotein, das mit der seltenen, Ph-positiven chronischen neutrophilen Leukämie (CNL) assoziiert wird (Pane et al., 1996).

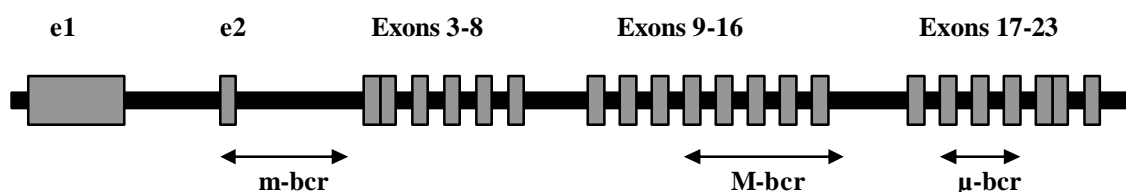


Abb. 1.4.1: Schematische Darstellung des Bcr-Gens und die Lokalisation der Exons und Introns. m-bcr bezeichnet das erste Intron, das verschiedene Bruchstellen enthält, die man vorwiegend bei der CLL (chronisch lymphatische Leukämie) findet. Die größte Anzahl von Bruchstellen in der CML finden sich in der M-bcr Region. μ -bcr-Varianten treten bei der CNL auf.

1.4.2 Das c-Abl-Gen

Das c-Abl-Gen ist das humane Homolog des v-Abl Onkogens des Abelson murine leukemia (MCV) Virus, das im Mausmodell zur prä-B-Zell-Leukämie führen kann (Abelson, 1970). Es liegt auf der Bande q34 des Chromosoms 9 und besteht aus 11 Exons. Insgesamt umfasst es 300 kb (Groffen et al., 1991). Exon 1 kann noch mal in Exon 1a und 1b unterteilt werden, die 175 kb von einander getrennt liegen. Das c-Abl-Gen kodiert für eine Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, die von der Drosophila bis zum Menschen hoch konserviert ist (Comer et al., 1995). Durch die Unterteilung des ersten Exons in 1a und 1b entstehen durch alternatives Splicing zwei Arten von c-Abl-Proteinen, die sich in 19 am N-Terminus gelegenen Aminosäuren unterscheiden. Das p145^{c-Abl} ist hauptsächlich im Kern lokalisiert. Ob die beiden c-Abl-Proteine unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen, ist ungeklärt.

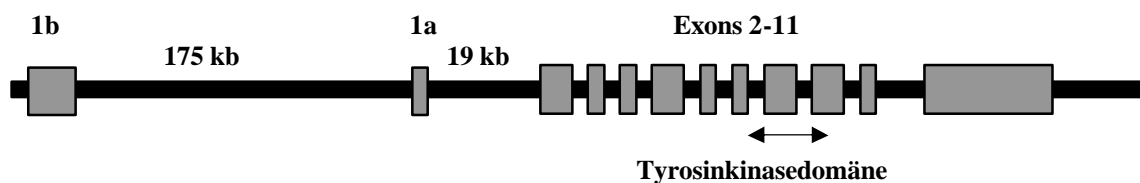


Abb. 1.4.2: Schematische Darstellung des Abl-Gens und die Lokalisation der Exons und Introns.

1.4.3 Die Philadelphia-Translokation

Die CML ist molekularer Ebene die am besten untersuchte Leukämie. 1960 wurde von Nowell und Hungerford erstmals ein verkürztes Chromosom 22 im Zusammenhang mit einer granulozytären Leukämie beschrieben. Es wurde in Knochenmarkzellen eines Patienten mit CML entdeckt (Nowell and Hungerford, 1960). Dies war das erste Mal, dass eine Assoziation zwischen einer neoplastischen Erkrankung und einer spezifischen chromosomalen Aberrationen gezeigt werden konnte (Rowley, 1990). Nach dem Ort ihrer Entdeckung wurde diese Veränderung Philadelphia Chromosom (Ph) genannt. Rowley konnte 1973 mit Hilfe der Darstellung einzelner Chromosomenabschnitten zeigen, dass es sich hierbei um eine reziproke Translokation handelt, welche die Chromosomen 9 und 22 betrifft. Hierbei kommt es zu

einem Bruch an der Bande q11 und einer Deletion des langen Armes von Chromosom 22 (22q-) sowie zu einer Addition diesen genetischen Materials auf den langen Arm des Chromosoms 9, dessen Bruchstelle sich auf der Bande q34 befindet (Rowley, 1973). Die Translokation verbindet Sequenzen der „breakpoint cluster region“ (Bcr) des Chromosoms 22 mit c-Abl auf den langen Arms des Chromosoms 9. Diese Hybridgene, bzw. die daraus hervorgehenden Fusionsproteine umfassen einen konsistenten Anteil des Abl-Gens, jedoch einen variablen Anteil des Bcr-Gens.

Im c-Abl-Gen auf dem Chromosom 9 (9q34) kann die Bruchstelle überall in einem 300 kb umfassenden Bereich zwischen der Region 5' von Exon 1a und 3' des Exon 1b liegen (Melo, 1996). Im Bcr-Gen auf dem Chromosom 22 sind die Strangbrüche auf die umschriebenen „breakpoint cluster regions“ begrenzt (s. Kap. 1.2.1). Die grösste Anzahl von Strangbrüchen finden sich in den Introns 1, 13, 14 und 15 (Lifshitz et al. 1988). Bei den letzten drei genannten handelt es sich um die bereits erwähnte M-bcr-Region. Je nach genauer Lokalisation innerhalb der M-bcr-Region entstehen unterschiedliche Transkripte, die als b3a2 und b2a2 mRNAs bezeichnet werden. Bei 5-10% der Patienten können durch alternative Splicevorgänge beide Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden. Bei mehr als 95% der Patienten mit CML kann das Fusionsprotein p210^{bcr-abl} nachgewiesen werden, das verglichen mit c-Abl eine erhöhte und deregulierte Tyrosinkinase-Aktivität aufweist (Warmuth et al., 1999; Davis et al., 1985). Es konnte durch Experimente an Mäusen bewiesen werden, dass Bcr-Abl maligne transformieren und Leukämie verursachen kann (Daley et al., 1990).

Liegt der Strangbruch innerhalb der m-bcr-Region, die das 54.4 kb lange Intron zwischen Exon 2' und 2 umfasst, wird eine e1a2-Fusions-mRNA gebildet, die in das Fusionsprotein p190^{bcr-abl} translatiert wird. Dieses Protein wird hauptsächlich mit der Ph-positiven ALL assoziiert (Melo et al., 1994).

Findet der Strangbruch in der μ -bcr-Region statt, so zeigt die mRNA die Variante e19a2. Daraus entsteht ein 230 kD grosses Fusionsprotein, dass dem Krankheitsbild der CNL zugeordnet wird (Pane et al., 1996).

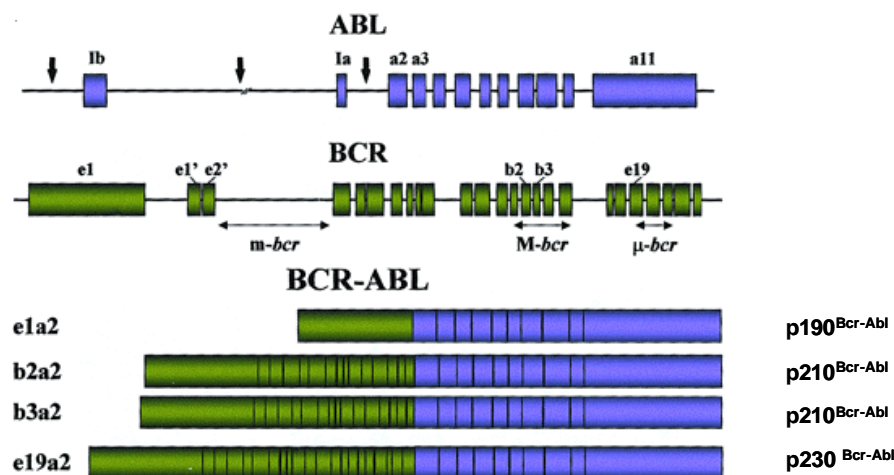


Abb. 1.4.3: Die Philadelphia-Translokation t(9; 22) (q34; q11) in der CML. Das Philadelphia-Chromosom ist ein verkürztes Chromosom 22, das aus der Translokation des 3' c-Abl Segments des Chromosoms 9 mit dem 5' Bcr Segment des Chromosoms 22 entsteht. In den meisten Fällen befinden sich die Bruchstellen auf dem Abl-Gen im Exon a2. Auf dem Bcr-Gen wurden verschiedene Bruchstellen lokalisiert. Je nachdem in welchem Exon sich die Bruchstelle befindet, entstehen verschieden grosse Segmente von Bcr, die mit dem 3' Sequenzen des Abl-Gens fusionieren. Daraus resultieren mRNAs von unterschiedlicher Grösse (e1a2, b2a2, b3a2 und e19a2), die in die jeweiligen Proteine (p190, p210 und p230) translatiert werden. p190 ist mit der CLL, p210 mit der CML assoziiert. p230 ist pathognomonisch für die seltene CNL. (Abb. Deininger et al., 2000)

1.4.4 Das p210^{Bcr-Abl}-Fusionsprotein

Die Bedeutung des Bcr-Abl-Fusionsproteins für die Induktion der CML konnte in in vitro- und in-vivo-Modellen belegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass 32D-Zellen, die normalerweise nur in Gegenwart von Wachstumsfaktoren überlebensfähig sind, durch Transfektion mit einem Bcr-Abl-kodierten Plasmid zur faktorunabhängigen Proliferation fähig sind (Daley and Baltimore, 1988). In Mäusen kann man durch Infektion von Knochenmarkszellen mit Bcr-Abl eine CML-ähnliche Erkrankung induzieren (Daley et al. 1990).

Im Gegensatz zu c-Abl findet man in Bcr-Abl eine deregulierte, dauerhaft aktivierte Tyrosinkinase-Aktivität, so dass man annimmt, dass das onkogene Potential des Fusionsproteins strukturell vom Bcr-Teil ausgeht. Man findet außerdem eine veränderte zelluläre Lokalisation des Proteins. Während c-Abl sowohl im Zytosol als auch im Zellkern

lokalisiert ist, findet man das Bcr-Abl-Protein fast ausschließlich im Zytoplasma, wo es unter anderen mit Bestandteilen des Zytoskeletts interagiert (Van Etten et al., 1989).

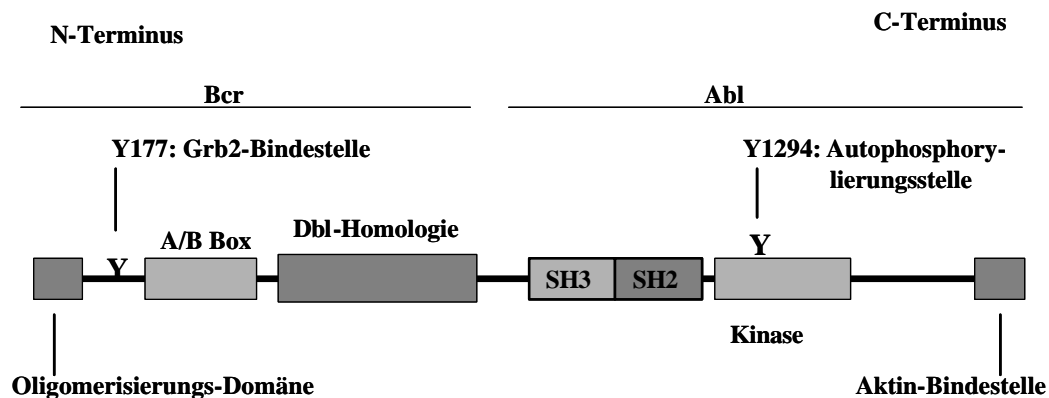


Abb. 1.4.4: Die molekulare Struktur des p210^{Bcr-Abl} Proteins.

Die ersten 63 Aminosäuren von Bcr, die das „coiled-coil“-Motiv enthalten, sind in der Lage, die Tetramerisierung von Proteinen zu induzieren (McWhirter et al., 1993). Dies ist sowohl für die Aktivierung der Tyrosinkinase als auch für die Aktivierung der Aktin-Bindungsstelle von Abl notwendig. An der Position 177 befindet sich die Aminosäure Tyrosin, die durch Abl autophosphoryliert wird und somit mit der SH2-Domäne des Ras-aktivierenden Adapterproteins Grb2 interagieren kann. Damit wird die Ras-Aktivierungskaskade (siehe 1.2.5) in Gang gesetzt. Die als A-/B-Box bezeichnete SH2-Bindungsdomäne ist in der Lage, verschiedene Signalproteine, unter anderem auch c-Abl zu binden (Pentergast et al., 1991). Inwiefern die darauffolgende Dbl-Homologiedomäne eine Rolle bei dem veränderten Verhalten Bcr-Abl positiven Zellen spielt, ist unklar (Warmuth et al., 1999).

Die SH3-Domäne von Bcr-Abl fungiert als Adapterregion, die prolinreiche Motive (P-X-X-P) zu binden vermag (Pawson, 1995). Die Bedeutung dieser Domäne in der Pathogenese der CML ist jedoch unklar. Drei Regionen im Abl-Teil des Fusionsproteins sind für die Transformation notwendig: die SH2-Domäne, die SH1-Domäne und die Aktin-bindende Region. Die SH2-Domäne fungiert als wichtiger Bindungspartner für zelluläre Proteine, die

über phosphorylierte Tyrosinreste gebunden werden können (Songyang et al., 1993). Die SH1-Domäne ist für die Phosphorylierung einer Reihe von Tyrosinen innerhalb des Fusionsproteins und die einer grossen Anzahl von zellulären Adapter- und Signalproteinen verantwortlich (Pentergast et al., 1993; Laneuville, 1995). Die Kinase-Domäne setzt sich aus zwei Untereinheiten, dem „N-Lobe“ und dem „C-Lobe“ zusammen. Zwischen diesen beiden Untereinheiten eingebettet findet man das katalytische Zentrum. Die katalytische Schleife (A-Loop) ist Teil des C-Lobes und beinhaltet an Position 1294 ein autoreglatives Tyrosin. Den C-Terminus bildet eine Aktin-bindende Region. Die Deletion dieser Region von Bcr-Abl zeigt eine signifikante Verminderung der Transformationsfähigkeit des Fusionsproteins in Fibroblasten und hämatopoetischen Zelllinien (McWhirter et al., 1993; Renshaw et al., 1995). Darüber hinaus hebt die Deletion die Lokalisation von Bcr-Abl am Zytoskelett auf.

1.5 Ziele der Arbeit

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Systems zur Selektion von niedermolekularen Kinase-Inhibitoren. Als Modell wurde dazu die Interaktion der Src-Kinase Hck mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP1 untersucht.

Folgende Untersuchungen sollten dazu durchgeführt werden:

1. Identifizierung der für die Bindung von PP1 relevanten Aminosäuren im aktiven Zentrum von Hck.
2. Gezielte Mutation der relevanten Aminosäuren zur Entwicklung Inhibitor-resistenter Varianten von Hck.
3. Biochemische Testung der Funktionalität der Inhibitor-resistenten Hck Varianten.
4. Evaluierung der Bedeutung von Inhibitor-resistenten Mutanten für Selektion und Validierung niedermolekularer Inhibitoren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Cos 7- Zellen (COS = CV1 Origin SV40):

Gewonnen durch Transformation der Affenzelllinie CV-1 mit einer replikationsdefekten Mutante des Affenvirus SV-40 Virus (Gluzman Y., 1981) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

2.1.2 Bakterienstämme

XL-1 Blue, Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacqZM15 Tn10 Tetr) (Stratagene, Heidelberg)

2.1.3 Allgemeines Labormaterial

a) Material und Geräte

- Aluminiumfolie M (Roth, Karlsruhe)
- Bakterieninkubator (Heraeus, Hanau)
- Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
- Dampfsterilisator Varioklav 400 (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Drygalski-Spartel (Schott, Germany)
- Glasgefäße (Bechergläser, Kolben, Standzylinder, Messgefäße) (Schott, Germany)
- Heizblock (Techne, Cambridge GB)
- Impfösen (Sarstedt, Nürmbrecht)
- Leukosilk[®] (Beiersdorf AG, Hamburg)
- Oak Ridge-Zenrifugenröhrchen (PSF) (Nalge Company, Rochester, USA)
- Parafilm M[®] (American National Can, Greenwich USA)
- pH-Meter pH 530 (WTW, Weilheim)

- Pipetten (Gilson, Langenfeld)
- Pipettenspitzen, (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipetus[®]-akku (Hirschmann, Eberstadt)
- Power-Supplies (Bio-Rad, München)
- Probenröhrchen mit Stehrand 50 ml (Greiner, Frickenhausen)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Reinstwasseranlage (USF, Ransbach Baumbach)
- Schüttler (Bühler, Tübingen)
- Skalpell (Feather, YPN)
- Vortex (Heidolph, Kelheim)
- Waage (Sartorius, Göttingen)
- Wasserbad (Köttermann, Hänigsen)
- Zentrifugen (Eppendorf, Hamburg) und (Sigma, Osterode)
- Zentrifugenröhrchen 15ml und 50 ml (Falcon, /Becton Dickinson, Heidelberg)

b) Chemikalien

- Aqua ad iniectabilia (Pharmacia GmbH, Erlangen)
- Bromphenolblau (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol 100% (Baker, Deventer, NL)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)
- Glucose (Merck, Darmstadt)
- Glycerol (Sigma, St. Louis, USA)
- Methanol (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Apotheke des Klinikum Grosshaderns, München)
- Phosphat-gepufferte Saline (PBS) (Gibco, Eggenstein)
- PCR-Primer (Metabion, Martinsried)
- PP1 (Alexis Biochemicals, San Diego, USA)
- Salzsäure (Apotheke des Klinikum Grosshaderns, München)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Apotheke des Klinikum Grosshaderns, München)

2.1.4 Material für DNA-Arbeit

a) Material und Geräte

- Elektrophoresekammer Wide Mini SubTM Cell und Zubehör (Bio-Rad, München)
- Gene-Quant (Pharmacia Biotech, Cambridge, GB)
- Inkubator B 6200 (37°C, ohne Begasung) (Heraeus, Hanau)
- PCR Maschine (Perkin Elmer, Norwalk, USA)
- Petrischalen (Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg)
- Polaroid MP-4 Land Camera und Filmkassetten (Polaroid, Cambridge, USA)
- Präzisionsküvetten (Pharmacia Biotech, Cambridge, GB)
- Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)
- UV-Transilluminator, 302 nm (Bachhofer, Reutlingen)

b) Chemikalien

- Agar (Gibco, Eggenstein)
- Agarose (Serva, Heidelberg)
- Ampicillin (Sigma, St. Louis, USA)
- β -Mercaptoethanol (Merk, Darmstadt)
- Calf intestinal phosphatase (CIP) und 10x CIP-Puffer (Promega, Madison, USA)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, Madison, USA)
- DNA Präparationskits (Qiagen, Hilden)
- Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)
- GeneClean II Kit (Boi 101, Carlsbad, USA)
- GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Boehringer, Mannheim)
- Glucose (Sigma, St. Louis, USA)
- Hefeextrakt (Gibco, Eggenstein)
- Inkubationspuffer für Restriktionsenzyme: Puffer A,B (Boehringer, Mannheim)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- Luria Agar (Gibco, Eggenstein)
- Luria Broth Base (Gibco, Eggenstein)
- Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Merck, Darmstadt)
- Magnesiumsulfat (MgSO_4) (Merck, Darmstadt)
- Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg)
- Polyethylenglycol (PEG) (Sigma, St. Louis, USA)

- Pfu-Polymerase und 10x Puffer für Pfu-Polymerase (Promega, Madison, USA)
- Restriktionsendonukleasen: Eco R1, Hind III, (Boehringer, Mannheim)
- 50x TAE-Puffer (Apotheke des Klinikum Grosshaderns, München)
- T4-DNA-Ligase und 10x Ligasepuffer (Boehringer, Mannheim)
- Trypton (Gibco, Eggenstein)

c) cDNA

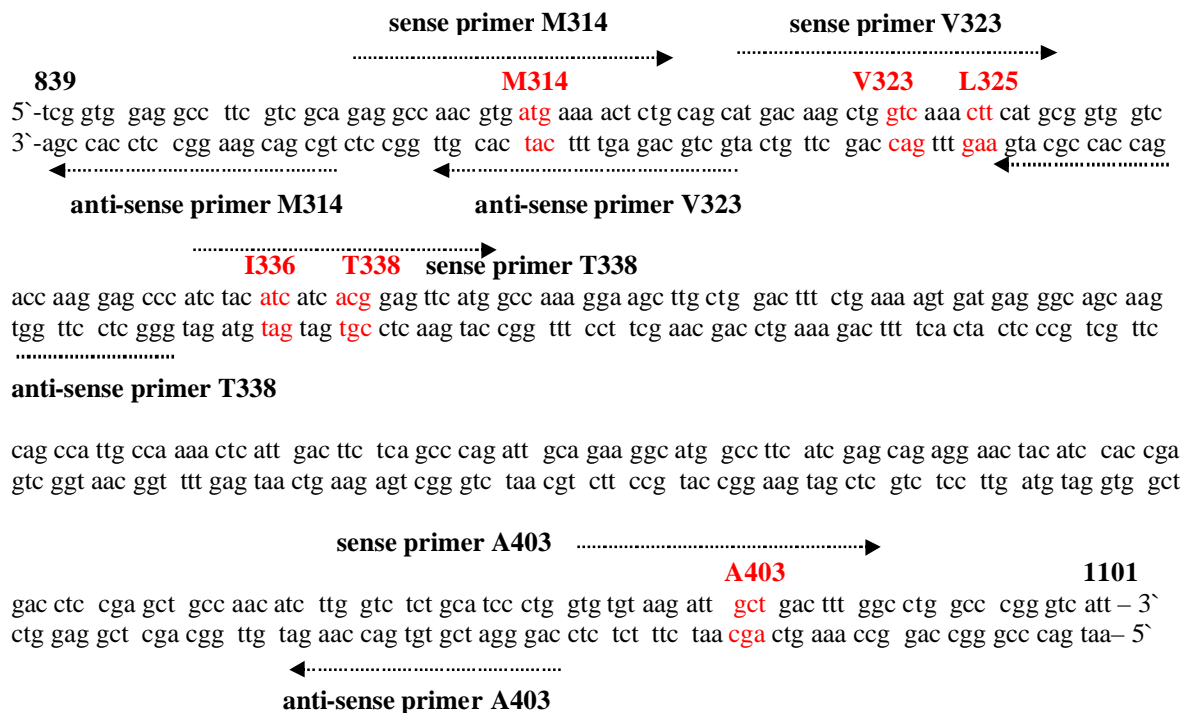
- Hck (Ziegler et al., 1987) (American Type Culture Collection, Rockville, USA)

d) Plasmide

- pApuro: Expressionsvektor für Säugetierzellen (Dr. Seth Corey, Pittsburgh, USA) (Takata et al., 1994)
- pUC NX Hck wt: Expressionsvektor für Hck wt (M. Warmuth, GSF, München)

e) Primer

Primerkarte (zur besseren Übersicht wurden nicht alle verwendeten Primer eingezeichnet, die genaue Sequenz ist der Auflistung zu entnehmen)



Mutante M314T:	5`-gaggccaacgtga c gaaaactctg-3`	(sense)
	5`- tgcgacgaaggcctccaccga -3`	(anti-sense)
Mutante M314F:	5`-gaggcaacgtg ttc aaaactctgcag-3`	(sense)
	5`- tgcgacgaaggcctccaccga -3`	(anti-sense)
Mutante V323F:	5`-atgacaagctg ttc aaacttcacg-3`	(sense)
	5`-gctgcagagttttcatcacgtt -3`	(anti-sense)
Mutante L325F:	5`-agctggtcaaa ttt catgcggtg-3`	(sense)
	5`- tgtcatgctgcagcgtttcatca -3`	(anti-sense)
Mutante I336T:	5`-gcccatctaca c catcacggagt-3`	(sense)
	5`- ccttggtctggtggcgacttc -3`	(anti-sense)
Mutante I336F:	5`- agcccatctact t catcacggagt-3`	(sense)
	5`- ccttggtctggtggcgacttc -3`	(anti-sense)
Mutante T338L:	5`-atctacatcatc acg gagttcatg-3`	(sense)
	5`- gggctccttggtgaccaccg -3`	(anti-sense)
Mutante T338A:	5`-atctacatcatc g cggagttcatg-3`	(sense)
	5`- gggctccttggtgaccaccg -3`	(anti-sense)
Mutante T338M:	5`-atctacatcatc atg gagttcatg-3`	(sense)
	5`- gggctccttggtgaccaccg -3`	(anti-sense)
Mutante T338Q:	5`-atctacatcatc agg gagttcatg-3`	(sense)
	5`- gggctccttggtgaccaccg -3`	(anti-sense)
Mutante T338F:	5`-atctacatcatc ttc gagttcatg-3`	(sense)
	5`- gggctccttggtgaccaccg -3`	(anti-sense)
Mutante A403S:	5`-gtgtgtaagatt ct gactttggc-3`	(sense)
	5`- cagggatcgtgtgacaacga -3`	(anti-sense)
Mutante A403C:	5`-gtgtgtaagatt gt gactttggc-3`	(sense)
	5`- cagggatcgtgtgacaacga -3`	(anti-sense)
Mutante A403T:	5`-gtgtgtaagatt a ctgactttggc-3`	(sense)
	5`- cagggatcgtgtgacaacga -3`	(anti-sense)

Mutante A403V:	5`-gtgtgtaagattgttgactttggc-3`	(sense)
	5`- cagggatcgtgtgacaacga -3´	(anti-sense)
Mutante A403L:	5`-gtgtgtaagattcttgactttggc-3`	(sense)
	5`- cagggatcgtgtgacaacga -3´	(anti-sense)
Mutante A403I:	5`-gtgtgtaagattattgactttggc-3`	(sense)
	5`-cagggatcgtgtgacaacga-3´	(anti-sense)

Die ausgetauschten Basenpaare wurden in rot hervorgehoben (Metabion, München)

2.1.5 Material für Zellkultur, Transfektion und Zellyse

a) Material und Geräte

- Einmalpipetten steril (Costar, New York, USA)
- Inkubator (WTB, Tuttlingen)
- Kulturflaschen (Falcon/ Becton Dickinson, Heidelberg)
- Mikroskope (Zeiss, Oberkochen)
- Neubauer-Zählkammern (Brand, Wertheim)
- Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Sterilbänke (BDK, Sonnenbühl)
- Sterilfilter (Gelman Sciences, Ann Arbor USA)
- Zentrifuge 4K-1 (Sigma-Zentrifugen, Osterode/Harz)

b) Medien, Puffer und sonstige Chemikalien

- Aprotinin (Sigma, St. Louis, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (MEM) (Biochrom, Berlin)
- Dimethylsulfoxid (Sigma, St.Louis USA)
- Effectene Transfection Kit (Qiagen, Hilden)
- Fötales Kälberserum (FKS) (Gibco, Eggenstein)
- Leupeptin (Sigma, St.Louis USA)
- Natriumorthovanadat (NaVO_4) (Sigma, St.Louis USA)
- Natriumfluorid (Merck, Darmstadt)
- NP 40 (Sigma, St.Louis USA)
- PBS (PAN, Aidenbach)
- Penicillin-Streptomycin (Gibco, Eggenstein)
- Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF) (Sigma, St.Louis USA)
- RPMI 1640 Medium (PAN, Aidenbach)
- Trypanblau 0,5% (Serva, Heidelberg)
- Trypsin-EDTA-Solution (Gibco, Eggenstein)

2.1.6 Material für Proteinarbeit

a) Material und Geräte

- Beschichtetes Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Blotting Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)
- ECL- Hyperfilm[®] (Amersham, Braunschweig)
- Entwickler (Agfa-Gevaert, Leverkusen)
- Folioplast (Hartmann, Heidenheim)
- Gelelektrophorese-Systeme Protean[®] und Zubehör (Bio-Rad, München)
- Geltransferkammer (Bio-Rad, München)
- Verpackungsfolie Dow Saran (The Dow Chemical Company, USA)

b) Chemikalien

- Acrylamid (Serva, Heidelberg)
- Ammoniumpersulfat (APS) (Bio-Rad, München)
- Broad-Range-Marker (Bio-Rad, München)
- ECL[®] Detektions-System (Amersham, Braunschweig)
- Glycin (Bio-Rad, München)
- Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
- N-Tetramethylethyldiamid (TEMED) (Bio-Rad, München)
- SDS (Bio-Rad, München)

c) Antikörper

- α -Hck (N-30): polyklonaler Kaninchen-AK der Klasse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- α -Phosphotyrosin (PY-99): monoklonaler Maus-AK der Klasse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Amplifikation der DNA

a) Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Standard PCR-Ansatz:

Template-DNA (1:2000)	1 µl
Primer sense (100 pmol)	0,5 µl
Primer anti-sense (100 pmol)	0,5 µl
dNTPs (2mM)	5 µl
10x Pfu-Puffer	5 µl
Pfu-Polymerase	0,5 µl
reinst H ₂ O	37,5 µl

Es wurden durch die Firma Metabion Primer hergestellt, die die entsprechende Mutation enthielten. Als Template-DNA wurde pUC NX Hck wt verwendet und die jeweilige mutierte Nukleotidsequenz mittels PCR eingebaut. Hierfür wurde der sense und der anti-sense Primer von dem jeweiligen Bereich gewählt. Als Polymerase zur Amplifikation wurde Pfu-Polymerase eingesetzt. Die Temperatur, unter der die PCR ablief, wurde abhängig von dem Mittelwert der Schmelztemperaturen der jeweiligen sense Primer und anti-sense Primer gewählt.

b) Weiterbehandlung der neugewonnenen DNA

Die durch PCR gewonnene DNA wurde elektrophoretisch wie im Kapitel 2.2.3b dargestellt, aufgetrennt und das aus dem Agarosegel isolierte Fragment durch das in Kapitel 2.2.3a beschriebene Verfahren gereinigt. Anschliessend wurde das Segment in pUC NX Hck wt ligiert und in Bakterien transformiert. Die als Template in die PCR-Reaktionen eingesetzten DNAs, sowie neu klonierte Fragmente wurden durch Sequenzierung durch die Firma Medigenomix, überprüft. Die Mutation sowie die kompletten Sequenzen wurden bestätigt.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

a) Kultivierung von Bakterien

LB–Ampicillin-Medium (Ampicillinkonzentration 50 µg/ml):

Luria Broth Base	25 g
dH ₂ O	1000 ml
Ampicillin-Lösung (10 mg/ml)	5 ml

LB–Ampicillin-Agarplatten (Ampicillinkonzentration 50 µg/ml):

Luria Agar	18,5 g
dH ₂ O	500 ml
Ampicillin-Lösung (10 mg/ml)	2,5 ml

Zur Herstellung der Platten wurde das autoklavierte Medium nach dem Abkühlen auf 55°C in sterile Petrischalen gegossen. Nach der Polymerisation wurden die Platten invertiert bei 4 °C gelagert.

b) Plattenkultur

Dazu wurden die Bakterien aus einer Flüssigkultur mit einem Drygalski-Spatel auf sterile LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

c) Flüssigkultur

Mittels einer sterilen Impföse wurden Einzelkolonien von Plattenkulturen abgehoben, in LB/Amp-Medium übertragen und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde dann die Plasmid-DNA isoliert.

d) Transformation

SOC-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	0,25 g
dH ₂ O	485 ml
autoklavieren	
1 M MgCl ₂	5 ml

1 M MgSO ₄	5 ml
2 M Glucose	5 ml
sterilfiltrieren	

Für jede Transformation wurden 50 µl kompetenter E. coli XL1 blue Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA sowie 1 µl β-Mercaptoethanol wurden zugegeben (von einer Ligation 5 µl, bei gereinigter DNA 1 µl). Nachdem die Lösung aufgeschüttelt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert wurde, wurde im Wasserbad der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 400 µl SOC-Medium dazu gegeben und für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Etwa 100 µl dieser Kultur wurden dann auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.3 Präparation und Analyse von DNA

a) Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde aus Bakterien über Anionenaustauschersäulen isoliert. Es wurden Präparationen im "Mini"- und "Maxi"- Maßstab mit den Präparationskits und nach den Standardprotokollen von Qiagen durchgeführt. Für die Präparation im "Mini"-Maßstab wurden 3 ml, für die im "Maxi"-Maßstab 100 ml einer Übernachtskultur verwendet.

b) Elektrophoretische Auftrennung und Reinigung von DNA

Die DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch auftrennt. Dazu wurde die Agarose in der gewünschten Konzentration mit 1x TAE Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, mit einem entsprechenden Kamm bestückt und nach dem Erstarren in die entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer mit 100 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch die UV-Absorption des Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Durch parallel aufgetragene Größenmarker war eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente möglich.

c) Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA oder einzelnen DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen wurden der GeneClean Kit verwendet. Die zuvor mit dem Skalpell ausgeschnittenen Gelstücke wurden hierzu mit 400 µl Glasmilch-Puffer gemischt und bei 50 °C geschmolzen. Dann wurde die Suspension durch eine Reinigungssäule zentrifugiert. Die glasmilchgebundene DNA wurde einmal durch Zentrifugation mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und abschließend mit 50 µl ultrafiltrierten Wasser aufgenommen.

d) Umklonierung von DNA-Fragmenten

Zur Umklonierung von DNA-Fragmenten von dem pUC NX Vektor in den pApuro Vektor wurde ein Verdau mit Eco R1 verwendet. Alle Verdau wurden unter denen vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen durchgeführt. Für diesen präparativen Verdau wurden 15 µl der DNA mit 40 U des Enzyms bei einem Gesamtvolumen von 40 µl eingesetzt. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die bereits erwähnten Verfahren zur elektrophoretischen Auftrennung und Reinigung von DNA angewandt. Das gewünschte Segment wurde nun in den pApuro Vektor eingebaut. Die Ligation wurde mit 10 U Ligase in einem Gesamtvolumen von 40 µl im Ligase-Puffer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes direkt in kompetente Bakterien transformiert.

e) Enzymatische Reaktionen an DNA

Um den richtig gerichteten Einbau des DNA-Fragments mit der Mutation in den pApuro Vektor zu überprüfen, wurde dieser mit der Restriktionsendonukleasen Hind III verdaut. Für den analytischen Verdau wurden hierbei 4 µg DNA mit 30 U Enzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über eine Stunde bei einer vorgegebenen Temperatur von 37°C in 10 µl Gesamtvolumen. Die Kontrolle der Spaltung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Bei dem richtigen gerichteten Einbau konnten Fragmente der Grösse 5550 kB, 575 kB sowie 300kB identifiziert werden. Die Fragmentgrößen bei dem falsch gerichteten Einbau beliefen sich auf 5175 kB, 950 kB und 300 kB.

2.2.4 Zellkultur der Cos7-Zellen

Kulturmedium:

DMEM	4,5 g/l Glucose
FCS	10 %

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Dazu wurden die adhären wachsenden Zellen zunächst durch eine kurze Inkubation mit Trypsin abgelöst. Diese Suspension wurde dann in etwas Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Danach wurde in einer neuen Kulturflasche etwas Medium vorgelegt und die ebenfalls mit frischem Medium resuspendierten Zellen entsprechend der gewünschten Verdünnung eingesät.

2.2.5 Transfektion der Zellen und Inkubation mit PP1

a) Transfektion

Transfektionsmedium:

DMEM	1,0 g/l Glucose
FCS	10 %
Penicillin-Streptomycin	1 %

Die Cos7-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in dem Kulturmedium so ausgesät, dass die jeweiligen Kulturflaschen am darauffolgenden Tag zu ca. 60% konfluent waren. Das alte Medium wurde vor der Transfektion abgenommen und verworfen. Die Transfektion wurde gemäss der Anleitung des Effectene Transfection Kits von Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden die angegebene DNA Menge mit dem EC-Puffer und den Enhancer umgesetzt, kurz rotiert und für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Effectene Transfektionsreagenz dazugegeben, 10 sec rotiert und für weitere 5-10 min inkubiert. Das Gemisch wurde dann zum dem in einzelnen Reaktionsgefässen vorgelegten Transfektionsmedium gegeben und gut vermischt, bevor es langsam den Zellen zugeführt wurde. 24 Stunden später wurde das alte Medium abgenommen und verworfen. Die adhären wachsenden Zellen wurden wie unter 2.2.4 beschrieben weiterbehandelt. Danach wurden sie

wieder für weitere 24 Stunden in frischen Transfektionsmedium ausgesät bis die Zellen lysiert wurden.

b) Inkubation mit PP1

Hierfür wurde das alte Medium am dritten Tag der Transfektion 4 Stunden vor der Lyse bereits abgenommen. PP1 wurde in der zu untersuchenden Konzentration in zuvor vorgelegtes Transfektionsmedium gegeben, das wiederum langsam den Zellen zugeführt wurde. Die Inkubation fand für 4 Stunden unter einer Temperatur von 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator statt.

2.2.6 Lyse der Zellen

Lysispuffer:

NP 40	0,5 %
EDTA	1 mM
Tris-Cl pH 7,4	50 mM
Natriumfluorid	1 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	15 %

Zusätzlich pro Milliliter Lysispuffer:

PMSF	10 µl
NaVO ₄	10 µl
Aprotinin	5 µl
Leupeptin	2 µl

Das Zellpellet wurde mit 250µl eisgekühlten Lysispuffers aufgenommen. Das erste Durchmischen erfolgte durch zweimaliges auf- und abpipettieren. Danach wurden die Proben 25 min auf Eis inkubiert wobei alle 5 min eine Kurzrotation stattfand. Schließlich wurde das Lysat durch Abzentrifugieren für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm von unlöslichen Anteilen wie größeren Membranteilen und nukleären Bestandteilen getrennt. In dem klaren Lysat sollten sich jetzt nur noch die zytosolischen und membranären Zellproteine befinden. Das Lysat wurde bei –80 °C eingefroren und später verwendet.

2.2.7 Westernblot

a) Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Lysate wurde ein Proteinassay durchgeführt. Dazu wurde eine Standardkurve nach dem Protokoll von Bio-Rad erstellt und Verdünnungen der Lysate mit dem Farbreagenz vermischt. Der Proteingehalt wurde dann nach photometrischer Messung der Blaufärbung bei 595 nm bestimmt. Für Westernblots wurden pro Ansatz 100 µg Gesamtprotein verwendet.

b) Herstellung der SDS-Polyacryl-Gele

Trenngel 8 % :

Acrylamid (40 %)	2 ml
4xTris-Cl/SDS pH 8,8	2,5 ml
dd H ₂ O	5,5 ml
TEMED	13 µl
APS 10%	33,3 µl

Ladegel 8% :

Acrylamid. (40 %)	480 µl
4xTris-Cl/SDS pH 6,8	1,25 ml
dd H ₂ O	3,3 ml
TEMED	5 µl
APS 10%	25 µl

Zwei Glasplatten (für 8 x 10 cm grosse Gele) wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und mit Spacern und Klammern versehen im Gelständer fixiert. Die Reagenzien wurden in der oben angegebenen Reihenfolge blasenfrei vermischt und vorsichtig zwischen die zwei fast waagerecht gehaltenen Glasplatten laufen gelassen. Der Zwischenraum wurde bis etwa 2 cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles auf dieselbe Weise mit etwas Wasser überschichtet und für eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Die Wasserschicht über dem auspolymerisierten Trenngel wurde abgegossen. Nach zweimaligen ausspülen mit Wasser wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit dem Ladegel gefüllt. Dann wurde ein vorher mit 70 % Ethanol gereinigter Kamm so eingesteckt, dass keine Blasen entstanden. Nach etwa 20 min wurde der Kamm

entfernt, die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült und das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt.

c) Laden und Starten des Gels

2x Probenpuffer:

4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	12,5 ml
SDS 10%	20 ml
β-ME	2 ml
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	1 mg
dd H ₂ O	45,5 ml

5x Elektrophoresepuffer:

Tris	15,1 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
dd H ₂ O	ad. 1000 ml

Die Lysate wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Reduktion für 5 min auf 100 °C erhitzt. Parallel wurde immer eine Bahn mit 5 µl Proteinmarker beladen. Der Gellauf erfolgte bei 120 V. Sobald die blaue Farbmarder-Bande am unteren Rand der Glasplatte angelangt war, wurde der Gellauf beendet. Das Sammelgel wurde am Ende abgeschnitten.

d) Transfer

Transferpuffer:

Tris	24,22 g
Glycin	115,3 g
Methanol	1600 ml
dd H ₂ O	ad. 8000 ml

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des

Gels zugeschnitten, kurz in dd H₂O eingelegt und dann in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden zwei Schwämme und zwei Whatman-Papierstücke von der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. In einer Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei aufeinandergelegt: Schwamm, Whatman, Gel, Nitrocellulose, Whatman, Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt, dass die Membran auf der Seite der Anode war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4 °C im Kühlraum und 100 V für eine Stunde.

e) Blocken der Membran

Blocking-Solution:

Milchpulver	1 g
1x TBS	ad. 40 ml

Nach der Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für 2 Stunden in einer Plastikschaale mit Blocking-Solution geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1x TBS gespült und einmal für 5 min in 1x TBS geschüttelt, um überschüssige Blocking-Solution wegzuwaschen.

f) Antikörper-Inkubation

Der primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung, die sekundären Antikörper in 1:200 Verdünnungen jeweils in Blocking-Solution eingesetzt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte für mindestens 2 Stunden in einer Plastikschaale mit 10 ml der Antikörperlösung. Danach wurde die Membran fünf mal 5 min mit TBS gewaschen, bevor der zweite Antikörper ebenfalls in dem Plastikschaalen für 40 min inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach erneutem viermaligem Waschen für jeweils 5 min.

g) Detektion der Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die beiden ECL-Lösungen wurden 1:1 gemischt. Die Membran wurde mit einem Papiertuch gut getrocknet und in einer Plastikschaale mit der Detektionslösung übergossen. Nach einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch getrocknet und mit der Proteinseite nach oben auf ein mit Kunststoff beschichtetes Papier gelegt. Das Ganze wurde mit einer Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und in einer Filmkassette für 2-60 Sekunden mit einem Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden.

3. Ergebnisse

3.1 PP1 inhibiert den Hck Wildtyp mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$

Zuerst wurde untersucht, mit welcher Konzentration von PP1 eine Reduktion der Phosphorylierung erzielt werden konnte. Dafür wurde der Hck Wildtyp (wt) in Cos7-Zellen exprimiert, die wiederum vor der Lyse für 4 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von PP1 inkubiert wurden. Dieses Titrationsexperiment identifizierte 50 $\mu\text{mol/l}$ als maximal inhibitorische Konzentration für diese Substanz. Mit dieser Konzentration wurden darauf hin alle weiteren Experimente durchgeführt. Auf die Untersuchung von wesentlich höheren Konzentrationen wurde auf Grund der guten Inhibierung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ verzichtet.

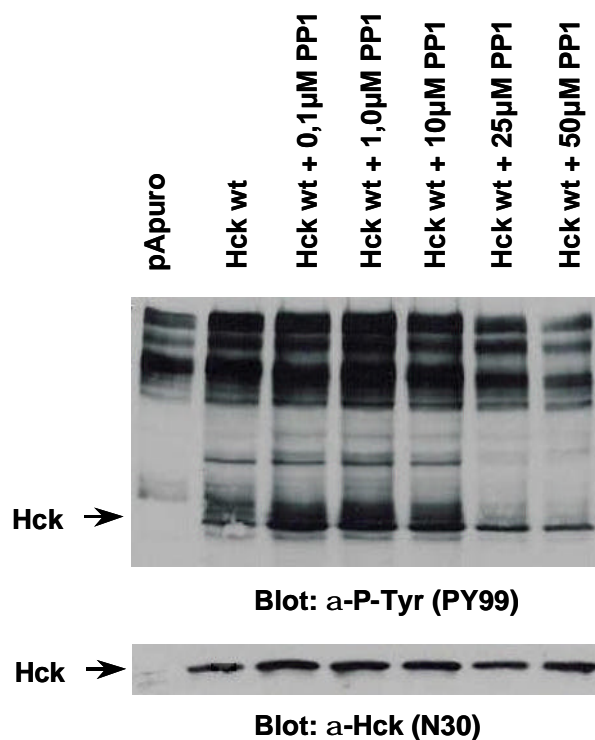


Abb. 3.1.1: Titrationsexperiment zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration von PP1. Bei der Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ ist eine eindeutige Reduktion der Phosphorylierung erkennbar.

3.2 Untersuchung der Hck Taschen-Mutanten auf Kinase-Aktivität und Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1

3.2.1 Die Mutation zu Phenylalanin an den Positionen L325 oder I336 zeigt Hck wt Kinase-Aktivität

Grundlage für die experimentell-genetische Untersuchung der Bindung von PP1 an Hck war die von Schindler und Kollegen publizierte Kristallstruktur der isolierten Kinase-Domäne von Hck im Komplex mit PP1 (Schindler et al., 1999). Es wurde angenommen, dass PP1 in die ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domäne bindet und so die Bindung von ATP als Substrat für die Phosphorylierungs-Reaktion blockiert. Diese Bindungsstelle ist eine hydrophobe Tasche, die von den jeweiligen Aminosäuren den Positionen M314, V323, L325 und I336 begrenzt wird. Diese Positionen wurden nach dem schon in Kapitel 1.2.3 erwähnten Prinzip mutiert. Zum einem wurde die Tasche durch Verlängerung der Aminosäureseitenkette durch den Austausch in Phenylalanin (F) unbrauchbar gemacht, zum anderen durch den Austausch in die polare Aminosäure Threonin (T). Dadurch entstanden die Taschen-Mutanten.

Diese Taschen-Mutanten wurden anschließend in Cos7-Zellen exprimiert, um sie auf ihre Kinase-Aktivität hin zu untersuchen, die sich nicht vom Wildtyp unterscheiden sollte. Dies wurde mit Hilfe von anti-Phosphotyrosin-Blots semiquantitativ untersucht.

Keine der Mutationen führte zu einem kompletten Verlust der Kinase-Aktivität. Es zeigte sich jedoch, dass die Mutanten, bei denen die besagten Positionen zu dem polaren Threonin mutiert wurden eine erheblich reduzierte Kinase-Aktivität als der Hck Wildtyp aufwiesen. Dies gilt auch für die Mutationen der Positionen M314 und V323 zu Phenylalanin, bei denen man nur eine geringe Autophosphorylierung beobachten konnte. Die Mutanten L325F und I336F hingegen zeigten dieselbe Kinase-Aktivität wie der Hck Wildtyp und sind somit für die Überprüfung auf die Resistenz gegenüber PP1 brauchbar.

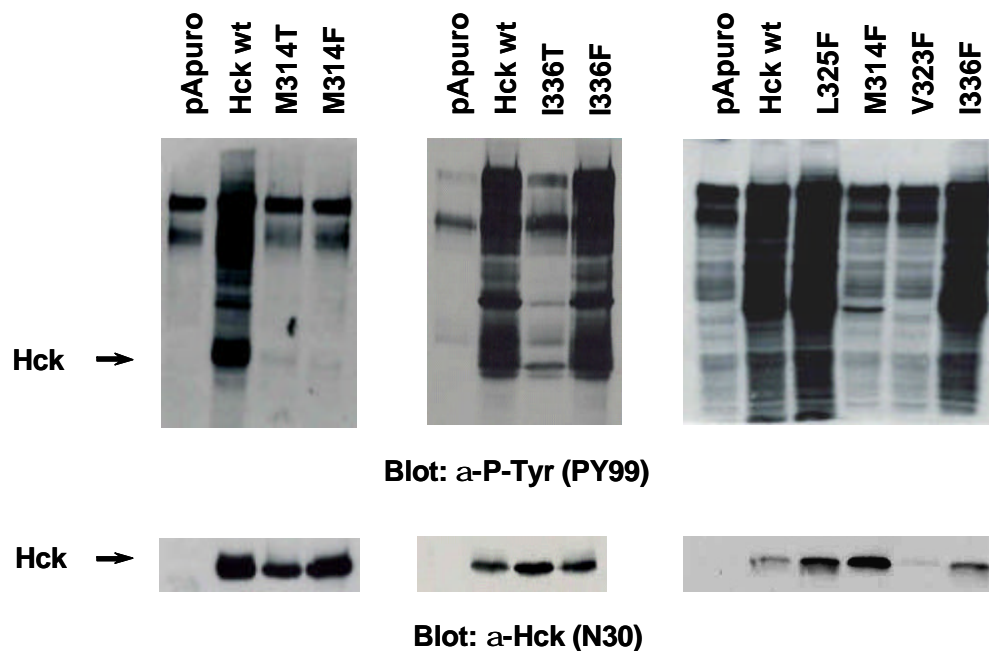


Abb. 3.2.1: Untersuchung der Kinase-Aktivität der Taschen-Mutanten. Die Mutation zu Threonin (T) zeigt bei allen Mutanten eine Reduktion der Kinase-Aktivität. Lediglich die Mutation der Positionen L325 und I336 zu Phenylalanin (F) zeigt die selbe Kinase-Aktivität wie der Hck Wildtyp.

3.2.2 Bei keiner der Taschen-Mutanten ist eine Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1 nachweisbar

Die Taschen-Mutanten, die an den Positionen M314, V323, L325 und I336 zu Phenylalanin mutiert wurden, wurden auf Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1 getestet. Dafür wurden sie erneut in Cos7-Zellen exprimiert und vor der Lyse vier Stunden mit 50 µmol/l PP1 inkubiert. Mit den anschließend hergestellten Westernblots konnte gezeigt werden, dass keine der Mutanten resistent gegenüber dem Inhibitor PP1 ist.

Die Mutanten M314F und V323F weisen wie schon oben erwähnt eine geringere Aktivität als die des Hck Wildtyps auf. Es ist dennoch eine weitere Reduktion der Phosphorylierung nach Inkubation mit PP1 nachweisbar. Besonders auffallend war die Reduktion der Phosphorylierung bei den aktiven Mutanten L325F und I336F. Diese ist vergleichbar mit der des mit PP1 inkubierten Hck Wildtyps.

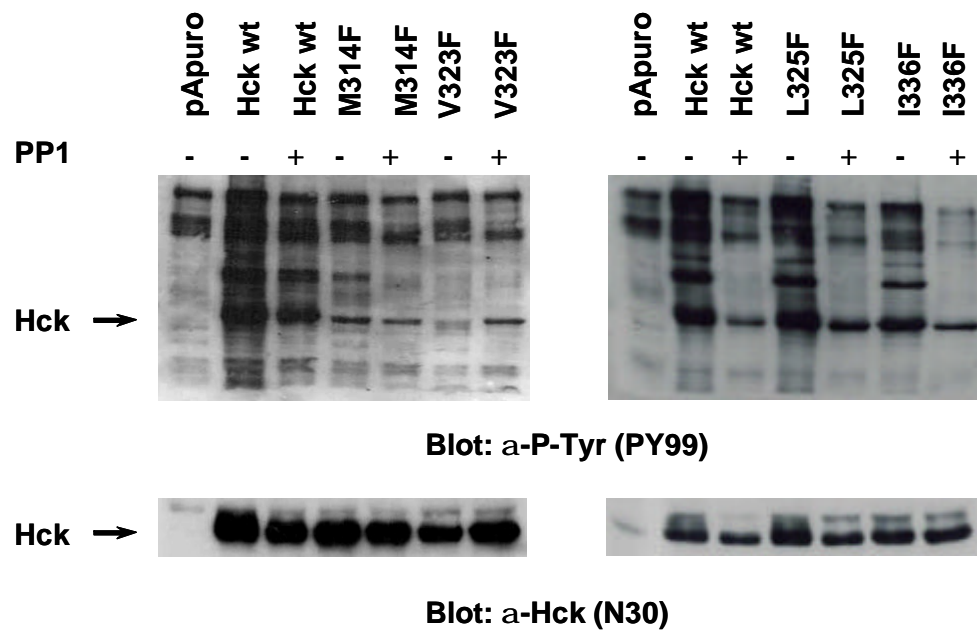


Abb. 3.2.2: Untersuchung der Taschen-Mutanten auf Resistenz gegenüber PP1. Bei keiner der Mutanten ist eine Inhibitor-Resistenz nachweisbar.

3.3 Untersuchung der Hck Eingangs-Mutanten auf Kinase-Aktivität und Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1

3.3.1 Die Mutationen an den Positionen T338 und A403 weisen Kinase-Aktivität auf

Die Positionen T338 sowie A403 entscheiden, wie schon in Kapitel 1.2.2 erwähnt, über die Zugänglichkeit der Tasche. Beide Positionen wurden zu solchen Aminosäuren mutiert, die in anderen Proteinkinasen an den homologen Positionen zu finden sind. Diese entsprechen Leucin (L) für beide Positionen, sowie Alanin (A), Methionin (M), Glutamin (Q) und Phenylalanin (F) an der Position T338. Die Position A403 wurde zu Serin (S), Cystein (C), Threonin (T), Valin (V) und Isoleucin (I) mutiert. Dadurch wurde der Eingang der Tasche graduell verkleinert um zu überprüfen ob diese zwei spezifischen Positionen kritisch für die Bindung von PP1 sind.

Die Mutanten wurden, wie schon die Taschen-Mutanten in Cos7-Zellen exprimiert und mit Hilfe von anti-Phosphotyrosin-Blots auf ihre Kinase-Aktivität hin untersucht, die sich wie schon bei den vorherigen Experimenten nicht von der des Hck Wildtyps unterscheiden sollte. Es zeigte sich, dass keine der Mutanten komplett die Kinase-Aktivität verloren hatte, jedoch wurde für die Mutanten T338A, A403I, A403V und A403L eine verminderte Kinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Für die Mutanten T338L und T338M wurde eine Hyperaktivität beobachtet. Diese Aktivität ist in etwa identisch mit der in der Literatur beschriebenen konstitutiv aktiven und transformierenden Mutante Y501F (Ziegler et al., 1987). Einen Austausch des Threonins an der Position 338 zu Glutamin und Phenylalanin führte zu einem dem Wildtyps identischen Phosphorylierungsgrad. An der Position 403 konnte das für den Austausch von Alanin zu Serin, Cystein und begrenzt auch für das Threonin gefunden werden. Diese aktiven Mutanten wurden in weiteren Experimenten wiederum auf die Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1 getestet.

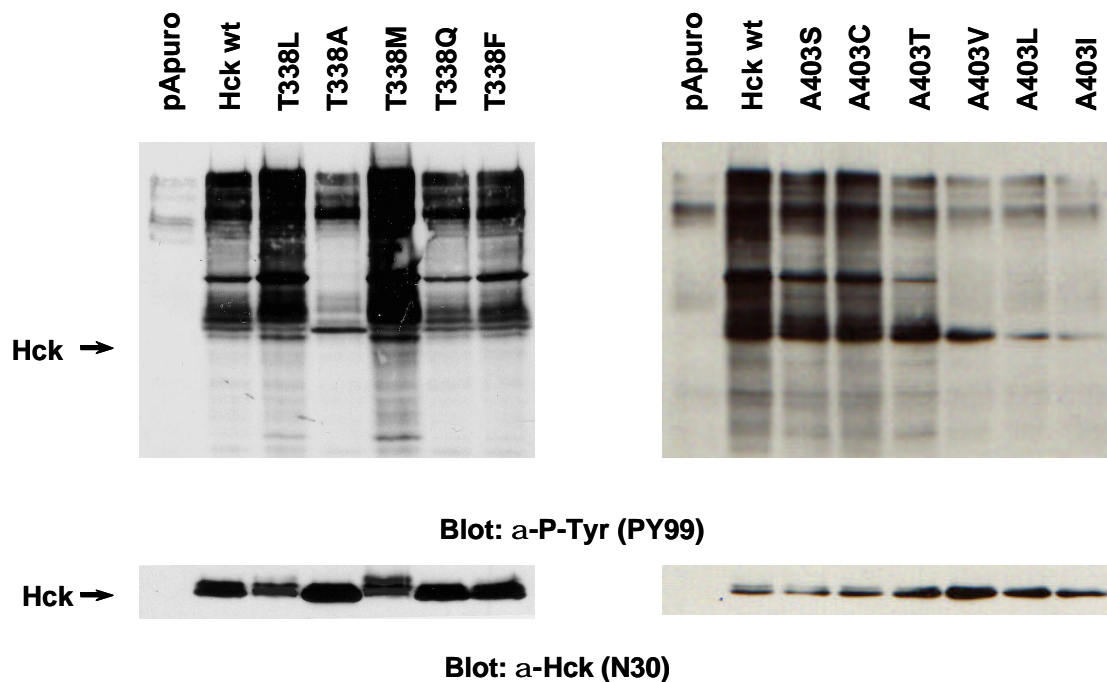


Abb. 3.3.1: Untersuchung der Eingangs-Mutanten auf ihre Kinase-Aktivität. Bei keiner der Mutationen an den Positionen T338 und A403 konnte ein kompletter Verlust der Kinase-Aktivität festgestellt werden. Die Mutanten T338Q und T338F sowie A403S, A403C und A403T zeigten eine dem Hck Wildtyp entsprechende Aktivität. Die Mutanten T338L und T338M zeigten eine Hyperaktivität. Die Mutanten T338A, A403V, A403L und A403I weisen eine reduzierte Aktivität auf, verglichen mit dem Hck Wildtyp.

3.3.2 Die Eingangs-Mutanten der Position A403 sind sensitiv gegenüber PP1

Nachdem nur die Mutationen der Position A403 zu Serin, Cystein und Threonin eine Kinase-Aktivität aufwiesen, wurden diese auf Inhibitor-Resistenz hin untersucht. Die Untersuchung ergab, dass sich die Mutationen nicht auf die Sensitivität von Hck gegenüber PP1 auswirkten. Die Reduktion der Phosphorylierung ist identisch mit dem des mit PP1 inkubierten Hck Wildtyps, von daher sind die Eingangs-Mutanten komplett inhibierbar. Dieser Versuch zeigt, dass PP1 die Position A403 nicht als Spezifitätsdeterminante anerkennt.

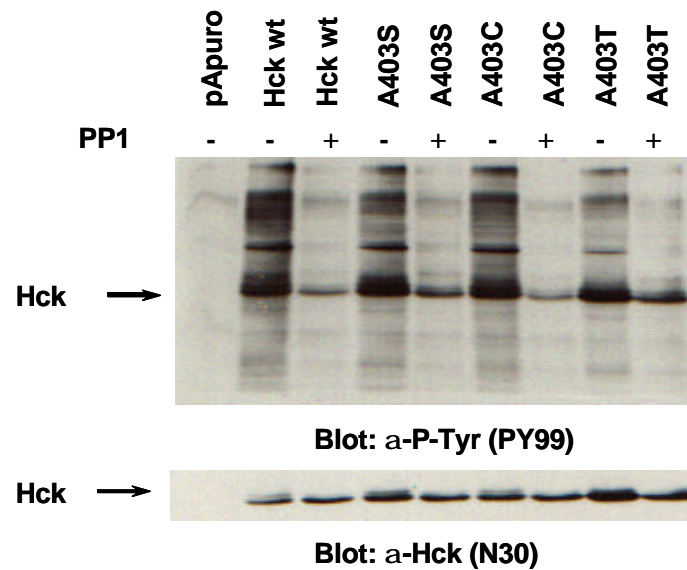


Abb. 3.3.2: Untersuchung der Eingangs-Mutanten der Position A403 auf ihre Inhibitor-Resistenz. Keine der untersuchten Mutanten zeigte eine Resistenz gegenüber PP1.

3.3.3 Die Mutation der Position T338 zu Leucin, Methionin, Glutamin oder Phenylalanin zeigt Resistenz gegenüber PP1

Die aktiven Mutanten der Position T338 wurden nun auf die Resistenz gegenüber PP1 hin überprüft. Es zeigte sich, dass die Mutation dieser Position zu Leucin, Methionin, Glutamin oder Phenylalanin zu einer kompletten Resistenz gegenüber 50 $\mu\text{mol/l}$ PP1 führte. So konnte kein Unterschied in dem Phosphorylierungsgrad vor und nach der Inkubation mit PP1 festgestellt werden.

Zusammengefasst, belegen diese Daten eine entscheidende Funktion der Position 338 als molekulare Determinanten der Bindung von PP1, so wie es aus der von Schindler und Kollegen publizierten Kristallstruktur abzulesen war. Sie zeigten, dass PP1, wie postuliert in die zur ATP-Bindungsstelle benachbarten hydrophobe Tasche bindet.

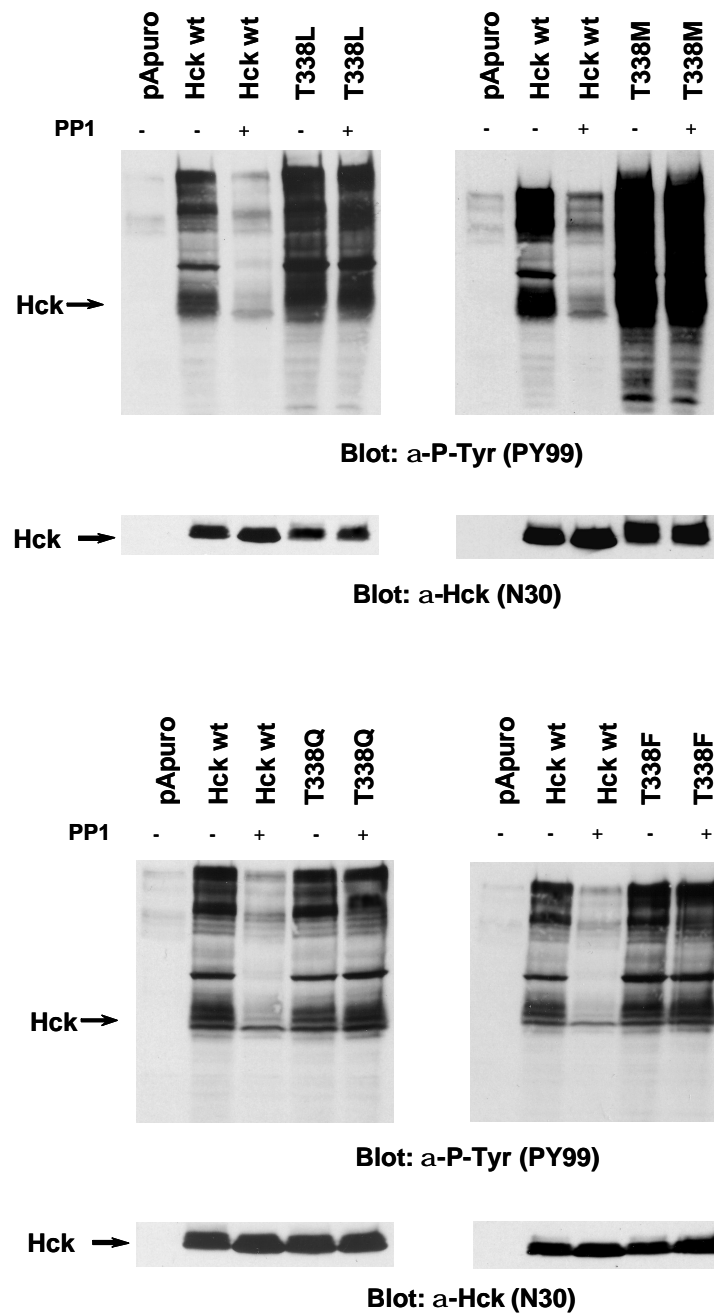


Abb. 3.3.3: Untersuchung verschiedener Eingangs-Mutanten der Position 338 auf Resistenz gegenüber PP1. Die Mutation des Threonins mit Glutamin, Phenylalanin, Leucin und Methionin zeigen Inhibitor-Resistenz. Es konnte keine Reduktion im Phosphorylierungsgrad nach der Inkubation mit PP1 festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung des Bindemechanismus des Kinase-Inhibitors PP1 mit der Src-Kinase Hck

Mit Hilfe gerichteter Mutagenese sollte sowohl der Bindungsmechanismus des Inhibitors PP1 an der Src-Kinase Hck als auch die molekularen Grundlagen seiner Spezifität untersucht werden. Ausgangsbasis hierfür war die von Schindler und Kollegen publizierte Kristallstrukturanalyse von Hck im Komplex mit PP1 (Schindler et al., 1999). Die dabei gewonnenen Daten trugen erheblich zum Verständnis des Bindungsmechanismus von PP1 an Hck bei.

Es wurden verschiedene Positionen innerhalb der katalytischen Domäne identifiziert, die den Zugang zu einer hydrophoben Bindetasche im Kern der Kinase beschränken. Normalerweise wird diese Tasche von ATP besetzt. Es handelt sich hierbei um die schon im Kapitel 1.2.3 beschriebenen Aminosäuren der Positionen 338 und 403 am Eingang der Tasche. Aufgrund der Besetzung dieser zwei Positionen mit den Aminosäuren Threonin und Alanin ist der Zugang zu der Tasche verglichen mit anderen Kinasen relativ gross. So findet man bei vielen Proteinkinasen längere und sperrigere Aminosäuren (vgl. Abb. 1.2.2 B). Um zu beweisen, dass diese Positionen als molekulare Kontrollstellen der Interaktion PP1 mit Hck agieren, wurden sie zu solchen Aminosäuren mutiert, die in anderen Proteinkinasen an den homologen Positionen zu finden sind. PP1 scheint den Eingang der Bindetasche optimal auszufüllen, da eine Einschränkung des Tascheneingangs durch die Verlängerung der Aminosäuren-Seitenkette nur um ein Kohlenstoffatom zu einer Resistenz gegenüber PP1 führt. Grundvoraussetzung war jedoch, dass die Kinase-Aktivität der Mutanten der des Wildtyps von Hck entsprach.

Die hydrophobe Tasche selber wird von den Aminosäuren der Positionen 314, 323, 325 und 336 beschränkt (s. Kapitel 1.2.3). Um heraus zu finden, ob es sich hierbei um für die Bindung von PP1 zu Hck kritische Aminosäurenpositionen handelt, wurde die Tasche durch Verlängerung oder Polarisierung der Aminosäureseitenkette an den jeweiligen Positionen unnutzbar gemacht.

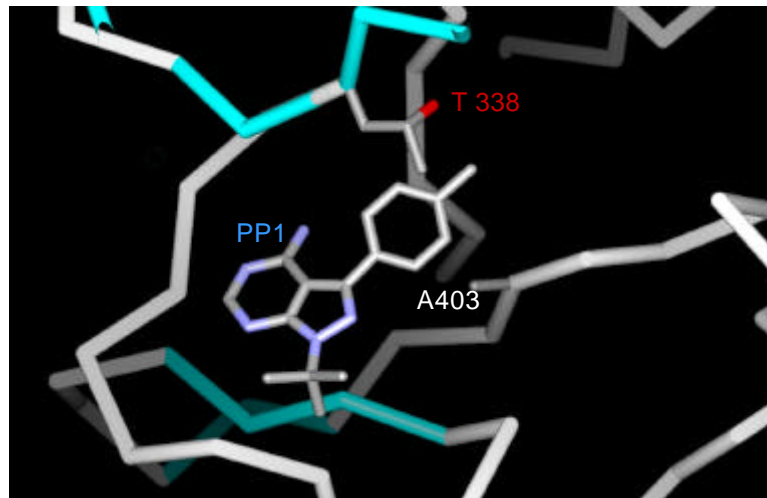


Abb. 4.1.1.: Schematische Darstellung des Eingangs zur hydrophoben Tasche im Komplex mit PP1. Deutlich wird die räumliche Nähe zwischen den begrenzenden Aminosäuren der Positionen 338, 403 und PP1. Die β -Faltblattstruktur der SH1-Domäne wurde blau dargestellt.

<u>Mutante</u>	<u>Kinase-Aktivität</u>	<u>PP1 Resistenz</u>
- Taschen-Mutanten		
Met 314 Thr	inaktiv	nicht getestet
Met 314 Phe	inaktiv	sensitiv
Val 323 Phe	inaktiv	sensitiv
Leu 325 Phe	aktiv	sensitiv
Ileu 336 Thr	inaktiv	nicht getestet
Ileu 336 Phe	aktiv	sensitiv
- Eingangs-Mutanten		
Thr 338 Leu	hyperaktiv	resistent
Thr 338 Ala	inaktiv	nicht getestet
Thr 338 Met	hyperaktiv	resistent
Thr 338 Gln	aktiv	resistent
Thr 338 Phe	aktiv	resistent
Ala 403 Ser	aktiv	sensitiv
Ala 403 Cys	aktiv	sensitiv
Ala 403 Thr	aktiv	sensitiv
Ala 403 Val	inaktiv	nicht getestet
Ala 403 Leu	inaktiv	nicht getestet
Ala 403 Ileu	inaktiv	nicht getestet

Abb. 4.1.2: Übersicht der untersuchten Mutanten auf ihre Aktivität und Inhibitor-Resistenz. Es sei darauf hingewiesen, dass bei den „inaktiven“ Mutanten zum Teil noch eine Restaktivität feststellbar ist, sie aber im Vergleich zu dem Hck Wildtyp inaktiv sind.

Auffallend war, dass die Modifikationen der Aminosäurepositionen innerhalb der hydrophoben Tasche größtenteils zur Inaktivierung der Mutanten führten. Meist sind dafür wohl sterische Behinderungen oder Interaktionen verantwortlich. Durch die Nähe der Position 314 zum C-Segment wäre es denkbar, dass die Änderung dieser Position zu Threonin und des Phenylalanins in die Regulation der Kinase eingreifen und sie dadurch inaktiviert wird. Die Position 325 wiederum befindet sich am Ende der Tasche, so dass sich ein Austausch des Isoleucins zu Phenylalanin nicht auf die Aktivität auswirkt. Sie scheint außerdem so weit von dem in die Tasche penetrierenden PP1 entfernt zu sein, dass keine Resistenz auftritt. An der Position 336 scheint das Phenylalanin gut in die Tasche zu passen, was sich durch die des Wildtyps entsprechende Aktivität widerspiegelt. Die polare Seitenkette des Threonins scheint mit benachbarten Strukturen zu interagieren, was deren Inaktivität bewirkt.

Betrachtet man die Eingangs-Mutanten, so stellt man fest, dass diese Position weniger kritisch für die Aktivität der Mutante zu sein scheint. So findet man bei dem Austausch des Threonins der Position 338 in Leucin, Glutamin und Phenylalanin eine dem Wildtyp entsprechende Aktivität. Durch die Abbildung 4.1.1 wird deutlich, dass die Vergrößerung der Aminosäurenkette an dieser Position die Bindung von PP1 unmöglich macht und so zu einer Resistenz von Hck führt. Dies bestätigt, dass PP1 über die Bindung in der hydrophoben Tasche wirkt und die Position 338 eine wesentliche Determinante für die Spezifität des Inhibitors ist.

Die Position 403 hingegen scheint PP1 nicht als Spezifitätsdeterminante anzuerkennen. Der Austausch des Alanins zu Serin, Cystein und Threonin führt zwar zur der des Wildtyps entsprechender Kinase-Aktivität, nicht aber zur Resistenz gegenüber PP1. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass wie in Abb. 4.1.1 erkennbar, die Aminosäurenkette von 403 aus der Tasche leicht herausragt und eventuell somit der Abstand zum PP1 grösser ist als bei dem Threonin der Position 338.

Die Hyperaktivität der Mutante T338M ist durch eine mögliche Interaktion mit dem räumlich benachbarten Leucin der Position 407 denkbar. Dass der Austausch des Threonins 338 in das Alanin zu einer Inaktivierung der Mutante führt war aus den Strukturdaten nicht vorhersehbar, da auch die Seitenkette mit nur einem Kohlenstoff wesentlich kleiner ist. Zu beachten gilt es hierbei jedoch, dass eine Kristallstruktur immer nur eine Momentaufnahme darstellt. Dynamische Konformationsänderungen können so nicht erkannt werden. Mit Hilfe dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die Src-Kinase Hck direkt durch PP1 über die Bindung in eine hydrophobe Tasche in Nachbarschaft zur ATP-Bindestelle inhibiert wird.

4.2 Bedeutung Inhibitor-resistenter Mutanten für die Selektion und Spezifizierung von Kinase-Inhibitoren

Tyrosinkinasen sind wie schon in dem Kapitel 1.1.3 beschrieben an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen, insbesondere hämatopoetischer Neoplasmen beteiligt. Daher ist es nahe liegend, spezifische Inhibitoren dieser Kinasen für die Therapie der jeweiligen Erkrankungen zu entwickeln und anzuwenden. Grosse Probleme bereitet allerdings die strukturelle und funktionelle Homologie unter den Kinasen. Des Weiteren sind noch nicht alle Proteinkinasen und deren Beteiligung an Signalwegen identifiziert. Von daher kann die Entwicklung spezifischen Kinase-Inhibitoren nicht nur zur Therapie dienen, sondern auch zur Aufklärung von intrazellulären Signalwegen. Die Mutation einzelner Aminosäuren von Proteinkinasen kann wesentlich zu der Aufklärung der Interaktion eines entsprechenden Inhibitors mit der jeweiligen Kinase beitragen. Es kann nachgeprüft werden, ob der Inhibitor direkt auf die jeweilige Kinase einwirkt. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Inhibitor-resistenten Mutanten ein System etabliert, dass zur Selektion und Spezifizierung von niedermolekularen Kinase-Inhibitoren dient.

Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen und Homologievergleichen können Aminosäuren identifiziert werden, die relativ einzigartig oder spezifisch für eine bestimmte Proteinkinase sind. Diese Aminosäuren sind so genannte Spezifitätsdeterminanten für diese Kinase. Dabei kann es sich um einzelne Aminosäuren handeln, die wie im Fall von Hck in der hydrophoben Tasche oder am Eingang zu dieser liegen. Interagiert ein Inhibitor mit diesem Bereich, der Spezifitätsdeterminante, so wird ihm eine hohe Spezifität verliehen. Diese Spezifitätsdeterminante wird durch gerichtete Mutagenese graduell verändert. Mutanten, die veränderte Eigenschaften der Spezifitätsdeterminante aufweisen, können dann zur Selektion von Inhibitoren verwendet werden, die diesen Bereich zur Bindung benötigen. Es werden solche Substanzen als Inhibitoren selektiert, die ihre inhibitorische Wirkung durch Bindung an die Spezifitätsdeterminante entwickeln. Sie inhibieren folglich den Wildtyp der Kinase, nicht aber die Mutante.

Wie schon in Kapitel 4.1 erwähnt, ist das Threonin der Position 338 eine solche Spezifitätsdeterminante für PP1. Die Verlängerung der Aminosäurekette an dieser Position führt zu einer Resistenz von Hck gegenüber PP1. Im Gegensatz dazu führt die Mutation der Position 403 zu keiner Resistenz, obwohl diese Aminosäure auch den Eingang zu dieser Tasche begrenzt.

4.3 Anwendung des Systems zur funktionellen Untersuchung von Src-Kinasen

Bishop und Kollegen haben ein ähnliches System entwickelt, dass zur Spezifizierung und Optimierung von Tyrosinkinasen-Inhibitoren dient (Bishop et al. 2000, Bishop et al., 2001). Sie nahmen an, dass das Isoleucin der Position 338 in v-Src in nahen Kontakt mit dem C3-Phenylring und der N4-Aminogruppe des PP1 steht. Durch den Austausch des Isoleucins in die kleineren Aminosäuren Glycin oder Alanin, wurde der Eingang zu der ATP-Bindungstasche im Gegensatz zu dem oben angewendeten Verfahren, vergrößert, ohne jedoch die biologische Funktion des Wildtyps zu verändern. Die Kinase-Aktivität konnte nun nicht mehr durch PP1 gehemmt werden. PP1 wurde modifiziert, indem jeweils ein weiterer Phenylring an die mit der Position 338 in Kontaktstehenden Gruppen angehängt wurde (C3-Phenylring und N4-Amiogruppe). Diese neuen Inhibitoren wurden auf ihre Fähigkeit selektiv die mutierten Src-Kinasen zu hemmen getestet. Es wurde dabei herausgefunden, dass das C3-PP1-Analogon wesentlich potenter ist als das N4-PP1-Analogon. Durch das Anhängen der zusätzlichen Phenylgruppe wurde PP1 spezifischer und in seiner Wirkung optimiert. Ein solches System kann somit in vergleichenden Untersuchungen mit Wildtyp Kinasen eingesetzt werden um die Relevanz einer Kinase als therapeutisches Target zu verifizieren.

4.4 Klinische Anwendung von Kinase-Inhibitoren

Die Identifikation der Schlüsselrolle von Proteinkinasen bei der Entstehung von Krebs hat zu einem verstärkten Interesse in der Entwicklung von Kinase-Inhibitoren geführt. Mehr als 30 dieser Substanzen werden momentan in klinischen Studien getestet (Dancey and Sausville, 2003). Dies macht deutlich, dass Verfahren zur Selektion, Validierung und Optimierung von Inhibitoren eine enorme Bedeutung erlangt haben. Anhand von zwei Beispielen soll der therapeutische Ansatz der spezifischen Hemmung von Tyrosinkinasen in der klinischen Anwendung geschildert werden.

Imatinib wurde im May 2001 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Es war die erste zugelassene Substanz, die spezifisch eine Proteinkinase als Target benutzte. 1986 wurde von Nick Lydon bei Novartis ein Programm initiiert, das an der Entwicklung eines Abl-Inhibitors beteiligt war. 1992 wurde die Substanz CGP571148B, später STI-571 entdeckt (Cohen, 2002). Brian Druker konnte noch im gleichen Jahr nachweisen, dass die Zellproliferation und Tumormformationen von Bcr-Abl exprimierenden Zellen spezifisch durch STI-571 gehemmt werden konnte. In Zelluntersuchungen von peripheren Blut oder Knochenmark von an CML erkrankten Patienten, konnte eine Reduktion der bcr-abl positiven Kolonien von 92-98% erzielt werden, wobei die normalen Kolonien nicht inhibiert wurden (Druker et al., 1996). 2001 konnte in einer klinischen Studie die Effektivität STI-571 bei minimalen Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Druker et al., 2001), was zu einer raschen Zulassung dieser Substanz führte.

Obwohl Imatinib ein relativ spezifischer Inhibitor von Abl ist, konnte gezeigt werden, dass er mit annähernder gleicher hoher Potenz auch c-KIT und den PDGF-Rezeptor hemmt (Buchdunger et al., 2000). Es wurden erfolgreich klinische Studien zu der Behandlung von gastro-intestinalen stromalen Tumoren (GIST) mit Imatinib durchgeführt, bei denen c-KIT oder der durch den PDGF-Rezeptor aktivierte Signalweg dereguliert ist. Seit 2002 ist Imatinib auch für die Therapie dieser Tumoren zugelassen.

Die im Kapitel 1.3.5 angesprochene Problematik der schnellen Resistenzbildung gegenüber Imatinib bleibt bestehen. Es ist daher sinnvoll, mehr über die Inhibition von Abl an der Spezifitätsdeterminante herauszufinden um gegebenenfalls diesen Inhibitor zu optimieren. Neuere Ansätze gehen in die Richtung, Imatinib mit anderen Substanzen zu kombinieren die den von Bcr-Abl in Gang gesetzten Signalweg blockieren. Dazu gehören auch Pyrazolo-Pyrimidin Derivate wie PP1 oder PD166326. Tipping und Kollegen konnten in in vitro

Studien zeigen, dass verschiedene Inhibitoren dieser Substanzklasse die Proliferation von CML positiven Zellen hemmen, die durch Amplifikation und Überexpression gegenüber Imatinib resistent geworden sind. Allerdings scheinen sie keinen Effekt bei Resistenzen zu haben, die durch Punktmutationen wie T315I herbeigeführt wurden (Tipping et al., 2004). Festzuhalten bleibt, dass diese Inhibitoren nur Prototypen sind. Das in dieser Arbeit herausgearbeitete Selektionsmodell kann die Grundlage für weitere Identifizierung und Optimierung derartiger Substanzen hin zu einem optimalen Wirkungsprofil bilden.

Im Mai 2003 erhielt Iressa (Gefitinib, ZD-1839) die Zulassung der FDA als Monotherapie von lokal weit fortgeschrittenen oder metastasierten Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (non small cell lung cancer, NSCLC). Es handelt sich hierbei um einen niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitor, der kompetitiv die ATP Bindung zu dem EGF-Rezeptor (epidermal growth factor) hemmt. Man fand heraus, dass die Überexpression von EGF über den Ras-Signalweg die in Kapitel 1.1.3 beschriebene Kaskade aktiviert und auf diese Weise zur Proliferation und Differenzierung von Zellen führen kann (Ciardiello and Tortora, 2001). Der EGF-Rezeptor ist in malignen Tumoren epithelialen Ursprungs wie Lungen- und Brustkrebs überexprimiert.

Die Effektivität konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, was zu einer schnellen Zulassung der Substanz für den klinischen Einsatz führte. So konnte bei Patienten mit NSCLC eine Remissionsrate von 10,6% über durchschnittlich 7 Monate erzielt werden, bei denen sich keine Therapie als effizient erwiesen hatte. Des Weiteren ergab sich, dass von einer Kombinationstherapie Iressa mit platinhaltigen Chemotherapeutika keine Verbesserung des Therapieerfolges zu erwarten ist (Cohen, 2003). Es bleibt abzuwarten, ob der mittlerweile in Phase III geprüfte EGFR-Inhibitor OSI-774 zu einer höheren Remissionsrate führt.

Durch den schnellen Erfolg von Imatinib und Iressa wurden neue Modelle für die Entwicklung von target-spezifischen Therapeutika entwickelt. Auf Grund der hohen Spezifität ergeben sich nur geringen Nebenwirkungen. So vergingen von der Initialphase I/II der klinischen Studie bis zur Registrierung nur noch 4 bis 5 Jahre, im Vergleich zu über 7 Jahre im Rahmen von konventionellen Programmen (Shawver et al., 2002). Dies verdeutlicht, mit welcher Intensität momentan auf diesem Sektor geforscht wird und welches Potential in den Kinase-Inhibitoren für die Therapie von Krebserkrankungen steckt.

5. Zusammenfassung

Kristallstrukturuntersuchungen zur dreidimensionalen Struktur der Src-Kinase Hck im Komplex mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PP1 haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der Aminosäuren an verschiedenen Positionen kritisch für die Sensitivität von Kinasen gegenüber diesem Inhibitor sein können. In dieser Arbeit sollten die für die Bindung von PP1 und Hck relevanten Aminosäuren identifiziert werden und gezeigt werden, dass Hck direkt durch PP1 inhibiert wird. Es sollte ein System entwickelt werden, dass zur Selektion niedermolekularer Kinase-Inhibitoren dient.

In dieser Arbeit wurden PP1-insensitive Punktmutanten von Hck hergestellt. Die untersuchten Aminosäure-Positionen innerhalb von Hck begrenzen zum einen den Eingang zu einer hydrophoben Tasche (Position 338 und 403), zum anderen liegen sie innerhalb dieser Tasche (Positionen 314, 323, 325 und 336). Diese Positionen wurden durch Aminosäuren mit längeren oder polaren Seitenketten ersetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die mutierten Positionen innerhalb der hydrophoben Tasche nicht wesentlich an der Bindung zu PP1 beteiligt sind. So zeigt zwar die Mutation zu Phenylalanin an den Positionen L325 und I336 Wildtyp-Aktivität, allerdings ist bei keiner der Taschen-Mutanten Inhibitor-Resistenz gegenüber PP1 nachweisbar. Die meisten der untersuchten Eingangs-Mutanten (Position 338 und 403) zeigen eine dem Wildtyp Hck vergleichbare Aktivität. Allein die Position 338 konnte als einzige Spezifitätsdeterminante von Hck für den Inhibitor PP1 identifiziert werden, da die Mutation dieser Aminosäuren zu einer erheblichen Reduktion der Sensitivität der Kinasen gegenüber PP1 führte. Die Position 403 hingegen wird nicht als Spezifitätsdeterminante von PP1 anerkannt, da die Mutanten sensitiv gegenüber PP1 sind. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass PP1 die Src-Kinase Hck direkt über die Bindung in die hydrophobe Tasche in Nachbarschaft zur ATP-Bindungsstelle inhibiert.

Das etablierte System der Mutation einer Aminosäureposition, die entscheidend die Bindung eines Inhibitors beeinflusst, kann nützlich sein, um die biologische Potenz von Inhibitoren und deren Zielstruktur-Spezifität zu untersuchen. Es kann zudem für die Spezifizierung und Optimierung von Kinase-Inhibitoren herangezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

Abelson, H.T., Rabstein, L.S. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic independent disease in mice. *Cancer Res* 30, 2213 - 2222.

Adachi, T., Pazdrak, K., Stafford, S., Alam, R. (1999). The mapping of the Lyn kinase binding site of the common beta subunit of IL-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL-5 receptor. *J Immunol* 162, 1496 – 1501.

Allan, N.C., Richards, S.M., and Shepherd, P.C. (1995). Results of the UK Medical Research Council randomised multicenter trial of interferon alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet* 345, 1392 - 1397.

Amreim, K.E., Flint, N., Panholzer, B., Burn P. (1992). Ras GTPase-activating protein: a substrate and a potential binding protein of the protein-tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3343 – 3346.

Anderson, S.M., Carroll, P.M., and Lee, F.D. (1990). Abrogation of IL-3 dependent growth requires a functional v-Src gene product: evidence for an autocrine growth cycle. *Oncogene* 5, 317 – 325.

Appelbaum, F.R. (2001). Perspectives on the future of chronic myeloid leukemia treatment. *Semin Hematol* 38(3 Suppl 8), 35 - 42.

Arnold, L.D., Calderwood, D.J., Dixon, R.W., Johnston, D.N., Kamens, J.S., Munschauer, R., Rafferty, P. and Ratnofsky, S.E. (2000). Pyrrolo(2,3-d)pyrimidines containing an extended 5-substituent as a potent and selective inhibitors of lck I. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 2167 – 2170.

Baccarani, M., Rosti, G., de Vivo, A., Bonifazi, F., Russo, D., Martinelli, G., Testoni, N., Amabile, M., Fiaccini, M., Montefusco, E., Saglio, G. and Tura, S. (2002). A randomized

study of interferon-alpha versus interferon-alfa and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 99, 1527 – 1535.

Bagrodia, S., Taylor, S.J., Shalloway, D. (1993). Myristylation is required for Tyr-52 dephosphorylation and activation of pp60c-Src in mitosis. *Mol Cell Biol* 13, 1464 – 1470.

Bar-Sagi D., Rotin D., Batzer, A., Mandiyan, V., Schlessinger, J. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signalling molecules. *Cell* 74, 83 – 91.

Bennett, B.D., Cowley, S., Jiang, S., London, R., Deng, B., Grabarek, J., Groopman, J.E., Goeddel, D.V., and Avraham, H. (1994). Identification and characterization of a novel tyrosine kinase from megakaryocytes. *J Biol Chem* 269, 1068 – 1074.

Biernaux, C., Sels, A., Huez, G., Stryckmans, P. (1996). Very low level of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals. *Bone Marrow Transplant* 17 (suppl 3), 45 - 47.

Bishop, A.C., Moore, D., Scanlan, T.S. and Shokat, K.M. (1997). Screening a hydroxystilbene library for selective inhibition of the B cell antigen receptor kinase cascade. *Tetrahedron* 53, 11995 – 12004.

Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O. and Shokat, K.M. (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinases. *Nature* 407, 395 – 401.

Bishop, A.C., Buzko, O. and Shokat, K.M. (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol* 11, 167 – 172.

Bolen, J.B., Rowley, R.B., Spana, C., and Tsygankov, A.Y. (1992). The Src family of tyrosine protein kinases in hematopoietic signal transduction. *Faseb J* 6, 3403 - 3409.

Bolen, J.B., and Brugge, J.S. (1997). Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 371 – 404.

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Grigg, A., Arthur, C., Taylor, K., Herrmann, R., Lynch, K.P., and Huges T.P. (2002). High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI-571) resistance. *Blood* 99, 3472 – 3475.

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., et al., (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102, 276 – 283.

Briggs, S.D. and Smithgall, T.E. (1999). SH2-kinase linker mutations release Hck tyrosine kinase and transforming activities in Rat-2 fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 26579 – 26583.

Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. and Darnell, J.E., Jr. (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-Src. *Mol Cell Biol* 18; 2558 – 2558.

Brown, M.T., und Cooper, J.A. (1996). Regulation, substrates and functions of Src. *Biochim Biophys Acta* 1287, 121 - 149.

Buchdunger E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J., Lydon, N.B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduktion mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 295, 139 – 145.

Cao, X., Tay, A., Guy, G.R. and Tan, Y.H. (1996). Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 16, 1595 – 1603.

Cartwright, C.A., Eckhart, W., Simon, S. and Kaplan, P.L. (1987). Cell transformation by pp60c-Src mutated in the carboxy-terminal regulatory domain. *Cell* 49, 83 – 91.

Chan, V.W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A.L. and Lowell, C.A. (1997). Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 7, 69 – 81.

Ciardiello, F. and Tortora, G. (2001). A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. Cancer Res.* 7, 2958 – 2970.

Chronic Myeloid Leukemia Trialists` Collaborative Group. (1997) Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 89, 1616 – 1620.

Comer, A.R., Liebl, E.C., Hoffmann, F.M. (1995). Can clues to the molecular defects in chronic myelogenous leukemia come from genetic studies on the Abelson tyrosine kinase in fruit flies? *J Lab Clin Med* 125, 686.

Cohen, M.H., Williams, G.A., Sirdhara, R., Chen, G., Pazdur, R. (2003). FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist* 8, 303 – 306.

Cohen, P. (2002). Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews* 1, 309 – 315.

Copper, J.A. and King, C.S. (1986). Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-Src. *Mol Cell Biol* 6, 4467 – 4477.

Corbin, A.S., La Rosee, P., Stoffregen, E.P., Druker, B.J., Deininger, M.W. (2003). Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 101, 4611 – 4614.

Corey, S.J. and Anderson, S. M. (1999). Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* 93, 1 – 14.

Corso, A., Lazzarino, M., Morra, E., et al. (1995). Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation – a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol* 70, 79-82.

Cortez, D., Stoica, G., Pierce, J.H. and Pentegast, A.M. (1996). The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signalling pathway. *Oncogene* 13, 2589 – 2594.

Cortez, D., Kadlec, L., Pentergast, A.M. (1995). Structural and signalling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 5531 – 5514.

Cross, F.R., Garber, E.A., Pellmann, D. and Hanafusa, H. (1984). A short sequence in the p60Src N terminus is required for p60Src myristylation and membrane association and for cell transformation. *Mol Cell Biol* 4, 1834 – 1842.

Daley, G.O., Van Etten, R.A., Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824 - 830.

Daley, G.O. and Baltimore, D. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific p210bcr-abl protein. *Proc Natl Csci U S A* 85, 9312 – 9316.

Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003). Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Natures Reviews Drug Discovery* 1, 296 – 313.

Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Drucker, B.J., Emmerich, B., and Hallek, M. (1996). Activation of Src-Kinases p53/56^{lyn} and d p59^{Hck} by p210^{bcr-abl} in myeloid cells. *Cancer Research* 56, 3589 – 3596.

Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905 – 2927.

David-Pfeuty, T., Bagrodia, S., and Shalloway, D. (1993). Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src over expressed cells. *J Cell Sci* 105, 613 - 28.

Davis, R.L., Konopka, J.B., Witte, O.N. (1985). Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar in vitro kinase properties. *Mol Cell Biol* 5, 204 - 213.

Deininger, M.W., Bosse, S., Gora-Tybor, J., Yan, X.H., Goldman, J.M., Melo, J.V. (1998). Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Research* 58, 421 - 425.

Deininger, M.W., Goldman, J.M., Melo, J.V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343 - 3356.

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lyson, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561 – 566.

Druker, B.J. and Lyndon, N.B. (2000). Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* 105, 3 – 7.

Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C.L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344, 1031- -1037.

Druker, B.J. and The IRIS Study (2002) – International Randomized Study of Interferon +Ara-C Vs. STI-571 (Imatinib/Glivec/Imatinib) in Chronic Myeloid Leukemia.(ASCO abstract 1) (WWW document) URL <http://www.asco.org>

Epstein, F.H. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341, 16 - 172.

Faderl, S., Kantarjian, H.M., Talpaz, M. (1999). Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology (Huntingt)* 13(2), 169 - 80.

Fitzgerald, P.H., and Morris, C.M. (1991). Complex chromosomal translocation in the Philadelphia chromosome leukemias. Serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genetics and Cytogenetics* 57, 143 - 151.

Garcia-Manero, G., Talpaz, M., Kantarjian, H.M. (2002). Current therapy of chronic myelogenous leukemia. *Intern Med* 41(4), 254 - 64.

Giralt, S., Thall, P.F., Khouiri, I., et al. (2001). Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 97, 631 – 637.

Goldmann, J.M. (1997). Treatment of chronic myeloid leukaemia: some topical questions. *Baillière's Clinical Haematology*, Vol. 10, No. 2.

Goldmann, J.M., and Druker, B.J. (2001). Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood* 98, 2039 - 2042.

Goldmann, J.M. and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia – Advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349, 1451 – 1464.

Gonfloni, S., Williams, J.C., Hattula, K., Weijland, A., Wierenga, R.K. and Superti-Furga G. (1997). The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. *Embo J* 16, 7261 – 7271.

Gorre, M.E., Mohammend, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., und Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876 – 880.

Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1997). The chimeric BCR-ABL gene. *Baillière's Clinical Haematology* 10, 1 - 13.

Groffen, J., Morris, C., Heisterkamp, N. (1991). Philadelphia chromosome translocation. Deisseroth AB, Arlinghaus RB (eds) *Chronic myelogenous leukemia*. Dekker, NY, 181 - 209.

Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., et al. (1997). Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 337, 223 – 229.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175 – 182.

Hallek, M., Neumann, C., Schaeffer, M., Danhauser-Riedl, S., von Bubnoff, N., de Vos, G., Druker, B.J., Yasukawa, K., Griffin, J.D., and Emmerich, B. (1997). Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. *Exp Hematol* 25, 1367 – 1377.

Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringe, E.J., Pollok, B.A., and Connelly, P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 271, 695 – 701.

Hatakeyama M., Kono T., Kobayashi N., Kawahara A., Levin S.D., Perlmutter R.M., and Taniguchi T. (1991). Interaction of the IL-2 receptor with the Src-family kinase p56 lck: Identification of a novel intermolecular association. *Science* 252, 1523 - 1528.

Huges, T.P., Kaeda, J., Branford, S., Rudzki, Z., Hochhaus, A., Hensley, M.L., Gathmann, I., Bolton, A.E., van Hoomissen, I.C., Goldman, J.M. and Radich, J.P. for International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group. (2003). Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 349, 1423 – 1432.

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., et al. (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16, 2190 – 2196.

Hunter, T. (1987). A tail of two Src`s: mutatis mutandis. *Cell* 49, 1 – 4.

Ilaria, R.L.J. and Van Etten, R.A. (1996). P210 and P190 (BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704 - 31710

Johnson, L., Noble, M., and Owen, D. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149 – 158.

Jove, R. and Hanafus, H. (1987). Cell transformation by viral Src oncogene. *Annu Rev Cell Biol.* 3, 31 – 56.

Kantarjian, H.M., Smith, T.L., O'Brien et al. (1995). Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon- α therapy. *Annals of Internal Medicine* 122, 254 – 261.

Kantarjian, H.M., Dixon, D., Keating, M.J., Talpaz, M., Walters, R.S., McCredie, K.B., et al. (1988). Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 61, 1441 – 1446.

Konopka, J.B., Watanabe, S.M., and Witte, O.N. (1994). An alteration of the human c-Abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37, 1035 – 1042.

Kruger, A. and Anderson, S.M. (1991). The v-Src oncogene blocks the differentiation of a murine myeloid progenitor cell line and induces a tumorigenic phenotype. *Oncogene* 6, 245 – 256.

Kurzrock, R., Shtarid, M., and Romero, R. (1987). A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 325, 631 - 635.

Kypta, R., Goldberg, Y., Ulug, E. and Courtneidge, S.A. (1990). Association between the PDGF receptor and members of the Src family tyrosine kinases. *Cell* 62, 481 – 492.

LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Pico, A., Porter, M., Kuriyan, J., und Miller, W.T. (1998). Intramolecular regulatory interactions in the Src family kinase Hck probed by mutagenesis of a conserved tryptophan residue. *J Biol Chem* 273, 32129 - 32134.

Laneuville, P. (1995). Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol* 7; 255 – 263.

Levitzki, A. (1996a). Targeting signal transduction for disease therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 239 – 244.

-
- Levitzki, A. (1996b). SRC as a target for anti-cancer drugs. *Anticancer Drug Des.* 11, 175 – 182.
- Lifshitz, B., Fainstein, E., Marcelle, C., Shtivelmann, E., Amson, R., Gale, R.P., and Canaani, E. (1988). Bcr genes and transcripts. *Oncogene* 2, 113 – 117.
- Lionberger, J.M., Wilson, M.B., Smithgall, T.E. (2001). Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase defect Hck. *J Biol Chem* 16, 18581 – 18585.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D.O., and Shokat, K.M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol* 6, 671 – 678.
- Lowell, C.A. and Soriano, P. (1996). Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev.* 10, 1845 – 1857.
- Lowell, C., Niwa, M., Soriano, P. and Varmus, H. (1996). Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood* 87, 1780 – 1792.
- Mahon, F.X., Deiniger, M.W., Schultheis, B., et al. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosin kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96, 1070 – 1079.
- Mauro, M.J., Druker, B.J. (2001). Chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Oncology* 13, 3 - 7.
- McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K.M., Green, D.R., Cotter, T.C. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179 – 1187.

McWhirter, J.R., Galasso, D.L., Wang, J.Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13, 7587 – 7595.

McWhirter, J.R., Wang, J.Y. (1991). Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr-abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 11, 1553 – 1565.

Melo, J.V. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88, 2375 – 2384.

Melo, J.V., Myint, H., Galton, D.A., Goldman, J.M. (1994). P190 BCR-ABL chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukemia? *Leukemia* 8, 208 – 211.

Muthuswamy, S.K. and Muller, W.J. (1995). Direct and specific interaction of c-Src with Neu is involved in signalling by epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 11, 271 – 279.

Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A., and Nakagawa, H. (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-Src. *Nature* 351, 69 - 72.

Nicholson, K.M. and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381 – 395.

Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., Chang, A., Kraker, A., Jove, R. and Yu, H. (2002). Roles of activated Src and Stat3 signalling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001 – 7010.

Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497 - 1501.

Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., and Nakagawa, H. (1991). CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of Src family kinases. *J Biol Chem* 266, 24249 - 24252.

-
- Or, R., Shapira, M.Y., Resnick, I., et al. (2003). Non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukemia in first chronic phase. *Blood* 101, 441 – 445.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M. (1996). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88, 2410 - 2414.
- Pasternak, G., Hochhaus, A., Schultheis, B., Helmann, R. (1998). Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 124, 643 - 660.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573 - 579.
- Pawson, T. (1997). New impressions of Src and Hck. *Nature* 385, 582 – 585.
- Pentegast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., Schlessinger J., und Gishizky, M.L. (1993). BCR-ABL- induced oncogenesis is mediated by direct interactions with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175 – 185.
- Pentegast, A.M., Gishizky, M.L., Havlik M.H., and Witte, O.N. (1993). SH1 domain autophosphorylation of p210 BCR-ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol* 13, 1728 – 1736.
- Perlmutter, R.M. (1995). Control of T cell development by non-receptor protein tyrosine kinases. *Cancer Surv.* 22, 85 – 95.
- Puil, L., Liu, J., Gish, G., et al. (1994). Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13, 764 – 773.
- Resh, M.D. (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* 8, 403 - 412.

Renshaw, M.W., McWhirter, J.R., Wang, J.Y. (1995). The human leukemia oncogene bcr-abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. *Mol Cell Biol* 15, 1286 – 1293.

Rowley, J.D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by a quinacrine fluorescence and Giemsa straining. *Nature* 243, 290 - 293.

Rowley, J.D. (1990). The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer* 65, 2178 - 2184

Savage, D.G., Antmann, K.H. (2002). Imatinib mesylate – a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 346, 683 – 693.

Sawyers, C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 340, 1330 – 1340.

Sawyers, C.L. (2002). Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets. *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 111 – 115.

Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell* 3, 639 – 648.

Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T. and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinases. *Nature* 372, 786 – 791.

Schiffer, C.A., Hehlmann, R. and Larson, R. (2003). Perspectives of the treatment of chronic phase and advanced phase CML and Philadelphia chromosome positive ALL. *Leukemia* 17, 691 – 699.

Shawver, L.K., Slamon, D. and Ullrich, A. (2002). Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117 – 123.

Showalter, H.D. and Kraker, A.J. (1997). Small molecule inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor, the fibroblast growth factor receptor, and Src family tyrosine kinases. *Pharmacol. Ther.* 76, 55 – 71.

Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602 - 609.

Sicheri, F. and Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 777 – 785.

Sirard, C., Laneuville, P., Dick, J.E. (1994). Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood* 83, 1575 – 1585.

Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J.K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T.O., et al. (1997). Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 16, 6151 – 6161.

Sokal, J.E., Baccarani, M., Russo, D., Tura, S. (1988). Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 25, 49 – 61.

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767 – 778.

Stanglmaier, M., Warmuth, M., Kleinlein, I., Reis, S., Hallek, M. (2003). The interaction of the Bcr-Abl tyrosin kinase with the kinase Hck is mediated by multiple binding domains. *Leukemia* 17, 283 – 289.

Taguchi, T., Kiyokawa, N., Sato, N., Saito, M., and Fujimoto, J. (2000). Characteristic expression of Hck in human B-cell precursors. *Exp Hematol* 28, 349.

Takata, M., Hisataka, S., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H. and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca^{2+} mobilization through distinct pathways. *EMBO* 13, 1341 – 1349.

Tanaka, K., Takechi, M., Hong, J. (1989). 9;22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res.* 30, 352-358.

Tipping, A. J., Baluch, S., Barnes, D. J., Veach, D. R., Clarkson, B. M., Bornmann, W. G., Mahon, F. X., Goldman, J. M. and Melo, J. V. (2004). Efficacy of dual-specific Bcr-Abl and Src-family kinase inhibitors in cells sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Leukemia*, 18, 1352 – 1356.

Uzunel, M., Mattsson, J., Brune, M., Johannson, J.E., Aschan, J., Ringden, O. (2003). Kinetics of minimal residual disease and chimerism in patients with chronic myeloid leukemia after nonmyeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 101, 469 – 472.

Van Etten, R.A., Jackson, P., and Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmatic localisation. *Cell* 58, 669 – 678.

Verfaillie, C.M. (1998). Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 12, 1 - 29.

Verfaillie, C.M., McCarthy, J.B., and McGlave, P.B. (1992). Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia: decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *Journal of Clinical Investigation* 90, 1232.

Ward L.D., Hammacher A., Howlett G.J., Matthews J.M., Fabri L., Moritz R.L., Nice E.C., Weinstock J., and Simpson R.J. (1996). Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex. *J Biol Chem* 271, 20138 - 44.

Warmuth, M., Danhauser-Riedl, S., Hallek, M. (1999). Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* 18, 49 – 64.

Warmuth, M., Simon, N., Mitina, O., Mathes, R., Fabbro, D., Manley, P.W., Buchdunger, E., Forster, K., Moarefi, I., and Hallek, M. (2003). Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP 76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases. *Blood* 101, 664 – 672.

Weisberg, E. and Griffin, J.D. (2000). Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI-571 in BCR/ABL- transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 95, 4398 – 3505.

Wilson, M.B., Schreiner, S.J., Hyun-Jung, C., Kamerns, J., and Smithgall, T.E. (2002) Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene* 21, 8075 - 8088.

Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595 - 601.

Ziegler, S.F., Marth, J.D., Lewis, D.B. and Perlmutter, R.M. (1987). Novel protein-tyrosine kinase gene (Hck) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Mol Cell Biol* 7, 2276 – 2285.

7. Anhang

DNA Sequenz von humanen HCK

Dieser synthetische Klon ist Teil einer Sammlung von humanen Expression-Klonen hergestellt von dem Harvard Institute of Proteonomics (Quelle: www.ncbi.nlm.nih.gov).

Die in dieser Arbeit mutierten Sequenzen wurden rot hervorgehoben.

1	atggggtcga	tgaagtccaa	gttcctccag	gtcggaggca	atacattctc	aaaaactgaa
61	accagcgcca	gcccacactg	tcctgtgtac	gtgccggatc	ccacatccac	catcaagccg
121	gggcctaata	gccacaacag	caacacacca	ggaatcaggg	aggcaggctc	tgaggacatc
181	atcgtggttg	ccctgtatga	ttacgaggcc	attcaccacg	aagacctcag	cttcagaag
241	ggggaccaga	tggtggtcct	agaggaatcc	ggggagtggg	ggaaggctcg	atccctggcc
301	accggaagg	agggtacat	cccaagcaac	tatgtcgccc	gcgttgactc	tctggagaca
361	gaggagtggg	tttcaaggg	catcagccgg	aaggacgcag	agcgccaact	gctggctccc
421	ggcaacatgc	tggtctcctt	catgatccgg	gatagcgaga	ccactaaagg	aagctactct
481	ttgtccgtgc	gagactacga	ccctcggcag	ggagataccg	tgaacatta	caagatccgg
541	accctggaca	acgggggctt	ctacatatcc	ccccgaagca	ccttcagcac	tctgcaggag
601	ctggtggacc	actacaagaa	ggggaacgac	gggctctgcc	agaaactgtc	ggtgccctgc
661	atgtcttcca	agccccagaa	gccttgggag	aaagatgcct	gggagatccc	tcgggaatcc
721	ctcaagctgg	agaagaaact	tggagctggg	cagtttgggg	aagtctggat	ggccacctac
781	aacaagcaca	ccaaggtggc	agtgaagacg	atgaagccag	ggagcatgtc	ggtggaggcc
841	ttctggcag	aggccaacgt	gatgaaaact M314	ctgcagcatg	acaagctggt V323	caaaattcat L325
901	gcggtggtca	ccaaggagcc	catctacatc I336	atcacggagt T338	tcattggcaa	aggaagcttg
961	ctggactttc	tgaaaagtga	tgagggcagc	aagcagccat	tgccaaaact	cattgacttc
1021	tcagcccaga	ttgcagaagg	catggccttc	atcgagcaga	ggaactacat	ccaccgagac
1081	ctccgagctg	ccaacatctt	ggtctctgca	tcctggtgt	gtaagattgc A403	tgactttggc
1141	ctggcccggg	tcattgagga	caacgagtac	acggctcggg	aaggggcca	gttccccatc
1201	aagtggacag	ctcctgaagc	catcaacttt	ggctccttca	ccatcaagtc	agacgtctgg
1261	tcctttggtg	tcctgctgat	ggagatcgtc	acctacggcc	ggatccctta	cccagggatg
1321	tcaaacctg	aagtgatccg	agctctggag	cgtaggatacc	ggatgcctcg	cccagagaac
1381	tgcccagagg	agctctacaa	catcatgatg	cgctgctgga	aaaaccgtcc	ggaggagcgg

1441	ccgaccttcg	aatacatcca	gagtgtgctg	gatgacttct	acacggccac	agagagccag
1501	taccaacagc	agccattg				

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ruth Mathes
Adresse: Flat 3
25 Anglesea Place
Bristol BS8 2UN
England

Geburtsdatum/-ort: 02. November 1976 in München
Email: ruthmathes@web.de

Ausbildung

1987 – 1996 Erasmus-Grasser-Gymnasium, München
07/1996 Allgemeine Hochschulreife
1996 - 2003 Studium der Humanmedizin an der LMU, München
11/2003 Drittes Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

02/04 - 08/04 Pre-registration House Officer (ÄiP), Department of Surgery,
Bristol Royal Infirmary, Bristol, England

08/04 – 02/05 Pre-registration House Officer (ÄiP), Department of Medicine,
Musgrove Park Hospital, Taunton, England

02/05 – 10/05 Senior House Officer (Assistenzärztin), Accident and
Emergency Department, Frenchay Hospital, Bristol, England

seit 11/05 Senior House Officer (Assistenzärztin), Anaesthesia and
Intensive Care Unit, Rotation at the Weston General Hospital/
Southmead Hospital/ Frenchay Hospital, Weston super Mare
and Bristol, England

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Kollegialität und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnen möchte ich Karin Forster, die mich bis zuletzt in fachlichen Fragen und bei der Überarbeitung der Arbeit unterstützt hat. Besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Michael Hallek aussprechen. Ohne seine Hilfe und sein Engagement für die Arbeitsgruppe wäre diese Doktorarbeit nicht entstanden.

Danken möchte ich Markus Warmuth für dessen Betreuung im praktischen Teil dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Michael Schäffer für die Beratung im Rahmen des schriftlichen Teils und der Erstkorrektur dieser Arbeit bedanken, sowie bei Ismail Moarefi für seine Mithilfe dabei.

Chris van der Meijden danke ich sehr für die Hilfe im computertechnischen Bereich.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und Freunden für die jahrelange Unterstützung. Ohne sie wären das Studium der Humanmedizin sowie diese Arbeit nicht möglich gewesen.